

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Departamento de Processos Químicos

**PRODUÇÃO DE XILANASES ALCALINAS POR *Bacillus pumilus* E
SUA APLICAÇÃO NO BRANQUEAMENTO DE POLPAS KRAFT**

Cristiane Vanessa Tagliari → *[assinatura]*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia
Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Engenharia Química.

↓
M

Campinas-SP

Outubro 1999 → *[assinatura]*



UNIDADE	BRE/FEIG
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	39664
PROD.	229/99
C	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	2511,00
DATA	07-12-99
N.º CDD	

CM-00137467-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

T128p

Tagliari, Cristiane Vanessa


Produção de xilanases alcalinas por *Bacillus pumilus* e sua aplicação no branqueamento de polpas kraft / Cristiane Vanessa Tagliari.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadora: Telma Teixeira Franco.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

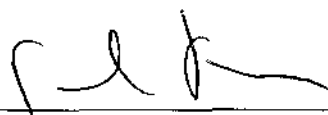
1. Xilanases. 2. Bacillus (Bactéria). 3. Branqueamento. 4. Fermentação. I. Franco, Telma Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Cristiane Vanessa Tagliari e aprovada pela Comissão Julgadora em 1º de outubro de 1999.

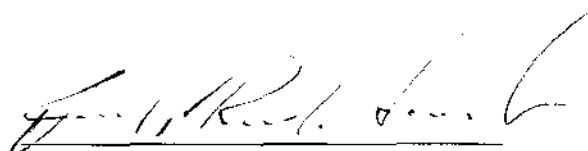


Prof.ª Dr.ª Telma Teixeira Franco

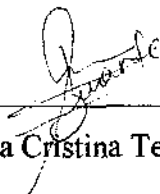
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 01 de outubro de 1999 pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:



Prof.ª. Dr.ª. Telma Teixeira Franco
(Orientadora)



Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol



Dr.ª. Marta Cristina Teixeira Duarte

DEDICATÓRIA

Ao meu marido
e aos meus pais
pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me ajudaram e me acompanharam durante esses anos, espero não esquecer de agradecer ninguém.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro ao projeto.

À Prof^a. Dr^a. Telma T. Franco um agradecimento especial, pois foi uma orientadora amiga e participativa, que nunca poupou esforços em me ensinar, porém, sempre exigiu o melhor, me incentivando a aprender cada vez mais e a superar até mesmo minhas expectativas.

À Dr^a. Marta do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/ UNICAMP, que me auxiliou com dedicação nas técnicas microbiológicas.

Ao Eng. Flávio Tesser (Champion Papel e Celulose LTDA), que além de ceder a polpa para os testes, permitiu o acompanhamento do processo de branqueamento utilizado pela empresa e colaborou com as análises da polpa após o tratamento com a enzima.

Ao Prof. Dr. Mangolini do IPT-USP, pelo auxílio na parte de branqueamento de papel.

Ao Prof. Dr. Francisco Maugerí Filho pelas valiosas sugestões.

Ao Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos FEA- UNICAMP, em especial à Fifa pela paciência e disposição em ajudar.

Aos funcionários da FEQ, especialmente para a Eunir, a Rosa, o Valmir e aos “meninos da oficina”, que sempre foram muito atenciosos.

À minha família que sempre me incentivou a estudar e me proporcionou condições para isto.

Ao meu marido, pois o seu apoio foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Aos meus padrinhos Valdir e Carmem que me ajudaram nos meses que estive sem bolsa.

Ao Gê e a Mi que me receberam como filha em sua casa.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que além de compartilhar os momentos de festa, me ajudaram a “descascar o abacaxi”, e tornaram o laboratório onde trabalhávamos num ambiente tão agradável que vou sentir muita saudade. Um agradecimento especial à minha “irmãzinha” Mônica, que participou em “tempo integral” destes anos de mestrado (obrigada pelas noites no leb), a Estelinha (que passou muito de sua experiência e conhecimentos, além de ser uma grande amiga), ao Chicão (que sempre teve muita paciência para ajudar), ao Érico (nosso “mascotinho” de iniciação), a Zea, a Ana Paula, o Everaldo, a Aninha, a Claudinha, a Angelita, aos colegas de laboratório que estão entrando agora, a Lisane, a Káthia e aos alunos de iniciação.

E a todos os amigos, que tornaram esses anos mais alegres e divertidos (Popô, Lu, Pops, Soraia, Montserrat, Lucy, e a todos os “vizinhos” de laboratório).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2. 1. FERMENTAÇÃO.....	3
2. 1. 1. <i>Meio de Cultivo</i>	5
2. 1. 2. <i>Microrganismo</i>	6
2. 1. 2. 1. Bactérias.....	7
2. 1. 3. <i>Degradação Enzimática de Xilanases</i>	7
2. 1. 4. <i>Produção de Xilanases por Bactérias</i>	8
2. 1. 5. <i>Otimização por Planejamento Experimental</i>	12
2. 2. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE XILANASES.....	14
2. 2. 1. <i>Aplicação de Xilanases em Branqueamento de Polpas de Papel</i>	14
2. 2. 1. 1. Características Necessárias para Aplicação Industrial de Xilanases	14
2. 2. 1. 2. Branqueamento Convencional de Polpas Kraft	15
2. 2. 1. 3. Branqueamento Enzimático	19
a) Mecanismos de Ação	22
b) Efeitos do Tratamento Enzimático no Branqueamento de Polpas Kraft	23
c) Fatores que Afetam a Eficiência do Tratamento Enzimático	25
2. 2. 2. <i>Outras Aplicações de Xilanases</i>	26

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3. 1. MATERIAIS.....	28
3. 1. 1. <i>Microrganismo</i>	28
3. 1. 2. <i>Reagentes</i>	28
3. 1. 3. <i>Meios de Cultivo</i>	28
a) Meio de Manutenção do Microrganismo	28
b) Meio de Cultivo Inicial (MANDELS e STENBERG, 1976).....	29
3. 2. MÉTODOS.....	29
3. 2. 1. <i>Métodos de Cultivo</i>	29
a) Preservação e Repique do Microrganismo	29
b) Preparo do Inóculo.....	29
c) Produção da Enzima.....	30
d) Centrifugação	30
3. 2. 2. <i>Ensaio de Otimização da Produção de Xilanases</i>	30
a) Primeiro Planejamento (2^{6-2}).....	31
b) Segundo Planejamento (2^{4-1}).....	31
3.2.3. <i>Ensaio Complementares</i>	31
3. 2. 4. <i>Ensaio de Branqueamento da Polpa Kraft com Xilanases</i>	32
3. 2. 5. <i>Métodos Analíticos</i>	33
a) Determinação da Atividade Xilanásica	33
b) Determinação da Atividade Celulásica	34
c) Eletroforese.....	35
d) Crescimento Celular.....	35
e) Determinação do Número de Kappa.....	35
f) Determinação da Viscosidade.....	37
g) Alvura.....	38
h) Cálculo da Eficiência de Deslignificação	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
4.1. PRODUÇÃO DE XILANASES.....	39
4. 1. 1. <i>Isolamento do Microrganismo</i>	39

4. 1. 2. <i>Atividade Celulásica</i>	40
4. 1. 3. <i>Otimização das Condições do Meio de Cultivo para Produção de Xilanases</i> 40	
4. 1. 3. 1. Primeiro Planejamento Fatorial Fracionário (2^{6-2}).....	40
a) Análise dos Efeitos de cada Variável sobre a Produção de Xilanases.....	42
4. 1. 3. 2. Segundo Planejamento Fatorial Fracionário (2^{4-1}).....	43
a) Atividade Enzimática em Função do Tempo de Fermentação.....	45
b) Produtividade.....	46
c) Curva de Atividade Xilanásica do Ensaio 7 do Segundo Planejamento.....	47
d) Análise dos Efeitos de cada Variável sobre a Produção de Xilanase.....	47
4. 1. 4. <i>Ensaio Complementares</i>	49
4. 1. 5. <i>Produção da Xilanase em Biorreator</i>	53
4. 1. 6. <i>Comparação da Produtividade de Xilanases com Dados da Literatura</i>	54
4.2. APLICAÇÃO DE XILANASES EM BRANQUEAMENTO DE POLPA KRAFT.....	56
5. CONCLUSÕES	60
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: Representação da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam.....	8
FIGURA 2.2: Processo de Branqueamento da Champion Papel e Celulose LTDA	18
FIGURA 2.3: Mecanismos de atuação da xilanase.	23
FIGURA 3.1: Sequência de branqueamento incluindo o tratamento enzimático.....	32
FIGURA 3.2: Esquema do viscosímetro.....	37
FIGURA 4.1: Atividade xilanásica dos isolados a 45°C, pH 5,0 e pH 10,0.	39
FIGURA 4.2: Efeitos das variáveis sobre a produção de xilanases no primeiro planejamento	42
FIGURA 4.3: Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental. (A) ensaios com mínimo de xilana; (B) ensaios com máximo de xilana; (C) ponto central.....	45
FIGURA 4.4: Produtividade ao longo da fermentação para o segundo planejamento.....	46
FIGURA 4.5: Curva de atividade xilanásica para o ensaio 7 do segundo planejamento	47
FIGURA 4.6: Efeitos das variáveis sobre a produção de xilanases no segundo planejamento	48
FIGURA 4.7: Monitoramento da produção de xilanases: a) crescimento celular; b) atividade xilanásica; c) consumo de xilana	50
FIGURA 4.8: Açúcares redutores presentes e atividade enzimática ao longo da fermentação do segundo planejamento experimental. (A) ponto central (com 3% de xilana); (B) ensaio 7 (com 1% de xilana); (C) ensaio 4 (com 5% de xilana)	51
FIGURA 4.9: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS dos caldos de fermentação do segundo planejamento: 1) Padrão de massa molar (Da); 2) Ensaio 9; 3) Ensaio 10; 4) Ensaio 11.	52
FIGURA 4.10: Monitoramento do pH no ponto central do segundo planejamento.....	53
FIGURA 4.11: Bioreator utilizado na produção de xilanases	54
FIGURA 4.12: Comparação entre os tratamentos com xilanases de <i>B. pumilus</i> e a xilanase comercial	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1: Comparação entre a fermentação no estado sólido e a submersa	4
TABELA 2.2: Bactérias produtoras de enzimas xilanolíticas descritas pela literatura	11
TABELA 2.3: Etapas frequentemente utilizadas em processos de branqueamento	16
TABELA 2.4: Resultados de branqueamento (MILAGRES, 1994)	20
TABELA 2.5: Resultados de branqueamento (BOCCHINI <i>et al.</i> , 1997)	20
TABELA 2.6: Resultados de branqueamento (ARAÚJO <i>et al.</i> 1997)	20
TABELA 2.7: Fornecedores industriais de xilanases	21
TABELA 2.8: Efeito do tratamento com xilanase na sequência convencional CEDED	24
TABELA 2.9: Condições de operação para branqueamento com xilanases	26
TABELA 3.1: Condições do tratamento enzimático	32
TABELA 3.2: Fator f para correção do consumo de permanganato	36
TABELA 4.1: Níveis das variáveis estudadas no primeiro planejamento	41
TABELA 4.2: Primeiro planejamento experimental fracionário 2^{6-2}	41
TABELA 4.3: Efeitos principais do primeiro planejamento em 24 horas de fermentação	42
TABELA 4.4: Níveis das variáveis estudadas no segundo planejamento	44
TABELA 4.5: Segundo Planejamento experimental fracionário 2^{4-1}	44
TABELA 4.6: Efeitos principais do segundo planejamento em 12 horas de fermentação	49
TABELA 4.7: Composição do meio de cultivo do ponto central do segundo planejamento	49
TABELA 4.8: Massa Molar das principais bandas das faixas 2, 3 e 4	53
TABELA 4.9: Composição do meio de cultivo para produção de xilanases no bioreator	54
TABELA 4.10: Comparação da produtividade obtida com dados da literatura	55
TABELA 4.11: Aplicação de xilanases de <i>B. pumilus</i> na polpa Kraft	56
TABELA 4.12: Aplicação da xilanase Comercial na polpa Kraft	56

NOMENCLATURA

AOX	Halogênio orgânico adsorvível
ART	Açúcares Redutores Totais
BSA	Proteína (albumina bovina)
C	Cloração
C _D	Tratamento com cloro e dióxido de cloro
D	Aplicação de dióxido de cloro
Da	Dalton
E	Extração alcalina
E _{op}	Extração alcalina com oxigênio e peróxido
MM	Massa Molar
O	Oxidação com oxigênio
P	Peroxidação
SDS	Tensoativo (dodecil sulfato de sódio)
TCF	Totally Chlorine Free
U	Unidade de atividade enzimática
X	Aplicação de Xilanase

RESUMO

Para reduzir os problemas ambientais, a indústria de papel e celulose vem buscando alternativas para seus processos de branqueamento através da tecnologia enzimática. Desta forma, xilanases tem sido empregadas durante o processo de pré-branqueamento de polpas Kraft, com intuito de diminuir a carga de cloro utilizada nas etapas subsequentes.

Xilanases ativas a altas temperaturas (acima de 45 °C) e pH alcalino possuem elevado potencial de aplicação em branqueamento de polpas de papel, já que podem ser introduzidas livremente nos diferentes estágios do processo sem a necessidade de drásticas etapas de resfriamento ou ajustes de pH. Bactérias são aptas a produzir enzimas que atuam nestas condições, tornando atrativo o estudo da produção de xilanase por *Bacillus pumilus*.

Para viabilizar a aplicação de xilanases em larga escala é necessário que esta seja obtida com alta produtividade e baixo custo. Neste trabalho foram investigadas as condições de produção de xilanases alcalinas por *B. pumilus* em fermentação submersa. O meio de cultivo foi estudado por planejamento estatístico, objetivando maximizar a produção de xilanases em frascos agitados. Após determinar as melhores condições de cultivo, um biorreator com volume útil de 2L foi utilizado para produzir a quantidade necessária de enzima para aplicação nos testes de branqueamento.

A maior produção da enzima em frascos agitados (129 U/mL) foi verificada no ponto central do segundo planejamento experimental em 20 horas de fermentação, o qual apresentava 3% xilana, 0,6% peptona, 0,15% sulfato de amônio e pH 9,5. Foi verificado que a produtividade aumentou (170 U/mL em 10 horas) quando a enzima foi produzida em biorreator de 2 L, evidenciando o potencial do *B. pumilus* para a produção de xilanases alcalinas e termofílicas.

Quanto a aplicação da enzima no pré-branqueamento de polpas Kraft, foi verificado uma deslignificação de 26% quando a polpa foi tratada com xilanases na dosagem de 50U/g polpa seca, resultado superior aos encontrados na literatura.

ABSTRACT

Environmental concerns, have put a restriction on the usage of chlorine during bleaching process in the paper and pulp industry. Therefore, xylanase pretreatment has been used to lower bleaching chemical consumption.

Enzymes which are active under alkaline conditions and higher temperatures, have great potential for industrial application, such as the bleaching process, without any need for cooling or changes in pH and with the advantage in lowering the release of polluting organic chlorine compounds. Bacteria are able to produce enzymes that act in these conditions, than being attractive xylanase production by *Bacillus pumilus*.

For industrial large scale application, the enzyme should be obtained with high productivity and low cost. This work investigated the optimal conditions of alkaline xylanases produced by *B. pumilus* in submerged fermentation. The culture media was studied by statistical factorial design, aiming to increase the xylanases production. The best conditions were applied in 2L bioreactor to produce the enzyme necessary for application in bleaching process.

The highest xylanase production in culture flasks (129 U/mL) was obtained at central point of the second factorial design in 20 hours of fermentation, which contained 3% xylan, 0.6% peptone, 0.15% ammonium sulfate and pH 9.5. It was observed that the productivity increased (170 U/mL in 10 hours) when the enzyme was produced in 2 L bioreactor, evidencing the potential of the *B. pumilus* for the production of thermophilic and alkaline xylanases.

The effect of xylanase treatment (50U/g pulp) on hardwood pulp was significant. A decrease of 2.5 units in kappa number was achieved (26% of delignification) suggesting that the xylanase from *B. pumilus* has a great potential in kraft pulp bleaching.

1. INTRODUÇÃO

A principal fonte de biomassa do planeta é constituída de materiais lignocelulósicos que são primariamente compostos de celulose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose representa aproximadamente 30% do total de carboidratos desses materiais, sendo formada de diferentes resíduos de açúcares como xilose, manose, galactose, glicose ou arabinose.

O principal constituinte da hemicelulose é a xilana, um heteropolímero composto de ligações β -1,4 de resíduos de D-xilanopirosil (DETROY, 1981). Esta cadeia pode estar substituída por grupos glucuronosil, arabinosil ou acetil, dependendo do vegetal. No caso de madeiras duras, tais como de eucalipto e bétula (birch), o grupo substituinte é o O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana e em madeiras moles como de pinus e de vários resíduos da agricultura, é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana.

A degradação enzimática da hemicelulose se dá pela ação sinérgica de endo e exo-xilanases (1,4- β -D-xilana hidrolase), que hidrolisam a cadeia principal de xilana, e β -xilosidases (β -D-xilosideo xilohidrolase) que hidrolisam xilooligômeros (BIELY, 1985).

Várias indústrias de alimentos, rações e de papel e celulose, utilizam matérias primas que tem como componente integral o polissacarídeo hemicelulolítico xilana. Para implementar os processos de produção ou gerar novos produtos, xilanases poderiam ser utilizadas, uma vez que tem a habilidade para modificar polissacarídeos.

O uso de hemicelulases no branqueamento de polpas Kraft é considerado uma das mais importantes e promissoras aplicações de enzimas em larga escala. O interesse em enzimas xilanolíticas, principalmente xilanases, visando facilitar o branqueamento de polpas, tem crescido nos últimos anos devido ao grande potencial de utilização destas enzimas em processos não prejudiciais do ponto de vista ambiental. Desta forma, xilanases tem sido empregadas durante o processo de pré-branqueamento da polpa de madeira, com intuito de diminuir a carga de cloro utilizada na etapa subsequente de branqueamento da polpa Kraft.

A substituição do cloro no branqueamento tem se expandido muito nos últimos anos gerando ganhos no contexto do impacto ambiental. A eliminação do cloro elementar melhora a cor do efluente, diminui a quantidade de organoclorados e, particularmente, a quantidade de dioxinas presentes.

Em vista do crescente interesse comercial, xilanases tem sido isoladas a partir de fungos filamentosos, leveduras, bactérias e actinomicetos. A abundância de estudos sobre enzimas hemicelulolíticas produzidas por fungos filamentosos mostra que a maioria das xilanases possuem atividade catalítica a valores de pH neutro ou ácido, e a temperaturas abaixo de 45 °C. Por outro lado, bactérias são aptas a produzir enzimas xilanolíticas tolerantes a álcali, o que torna atrativo o uso deste microrganismo para tais aplicações.

Xilanases ativas a pH básico e temperatura acima de 45°C possuem grande potencial de aplicação, já que podem ser introduzidas no processo de branqueamento do papel, sem ajustes de pH ou resfriamento.

Para viabilizar a aplicação de xilanases em larga escala é necessário que esta seja obtida com alta produtividade e baixo custo. Este trabalho investigou a produção de enzimas xilanolíticas alcalinas e termofílicas por *Bacillus pumilus*. Foram estudadas as condições ótimas para a produção desta enzima, incluindo pH inicial do meio de cultivo, temperatura de crescimento, tipo e concentração da fonte de nitrogênio e concentração da fonte de carbono. Também fez parte deste trabalho aplicar as xilanases no pré-branqueamento enzimático de polpas Kraft.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1. Fermentação

Os bioprocessos tiveram origem no uso de microrganismos para a produção de alimentos como queijos, iogurtes, lingüiças e conservas fermentadas, molho de soja e outros produtos orientais, cervejas e vinhos. Embora a tradicional forma de bioprocessamento no preparo de comidas e bebidas ainda represente a maior aplicação comercial, bioprodutos estão surgindo derivados de fermentações microbianas tais como:

- a) Metabólicos Primários: etanol, ácido acético, ácido láctico, glicerol, butanol, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e polissacarídeos.
- b) Metabólicos Secundários: penicilina, estreptomicina, cefalosporina, etc.
- c) Enzimas: as extracelulares amilase, pectinase e protease e as intracelulares invertase e asparaginase, etc. (já utilizadas industrialmente).

Os processos fermentativos geralmente são desenvolvidos em três escalas. O primeiro estágio envolve a seleção do microrganismo que é conduzida por procedimentos microbiológicos relativamente simples, usando placas de Petri, Erlenmeyers, etc. Esta etapa é seguida por uma investigação em planta piloto para determinar as condições ótimas de operação em um biorreator com volume de 5 a 200 litros. O estágio final é a transferência do estudo para a planta ou produção em escala industrial (STANBURY & WHITAKER, 1984).

Em processos fermentativos, o crescimento do microrganismo no biorreator pode ocorrer de três maneiras, em batelada, batelada alimentada ou em processo contínuo. As reações no biorreator podem ser na presença ou ausência de oxigênio, em culturas estáticas ou agitadas e em meio líquido ou sólido. O microrganismo pode estar livre ou fixo por imobilização ou por aderência natural. A Tabela 2.1 apresenta uma comparação entre a Fermentação no Estado Sólido e a Fermentação Submersa (ou líquida).

Tabela 2.1: Comparação entre a fermentação no estado sólido e a submersa.

Fator	Fermentação Submersa	Fermentação no Estado Sólido
Substrato	Solúvel (açúcares)	Polímero insolúvel (amido, celulose, pectinas e lignina)
Condições Assépticas	Esterilização com calor e controle asséptico	Tratamento com vapor, condições não estéreis
Água	Elevado volume de água consumido	Consumo de água limitado
Aquecimento Metabólico	Fácil controle de Temperatura	Baixa capacidade de transferência de calor
Aeração (oxigênio)	Limitação de oxigênio solúvel e requerimento de elevadas quantidades de ar	Aeração fácil e grande superfície de contato ar/substrato
Controle do pH	Fácil	Dificultado
Agitação Mecânica	Boa homogeneização	Preferencialmente em condições estáticas
Escalonamento	Equipamentos industriais disponíveis	Necessidade de projetos
Inoculação	Fácil, processo contínuo ou batelada	Inoculação de esporos, batelada
Contaminação	Riscos de contaminação por bactérias	Risco de contaminação pela baixa taxa de cresc. fúngica
Energia	Elevado consumo de energia	Baixo consumo de energia
Volume do Equipamento	Elevado	Pequeno
Efluentes	Grande volume de efluentes	Sem efluentes
Concentração Substrato/Produto	30-80 g/L	100-300 g/L

Fonte: RAIMBAULT *et al.*, 1998

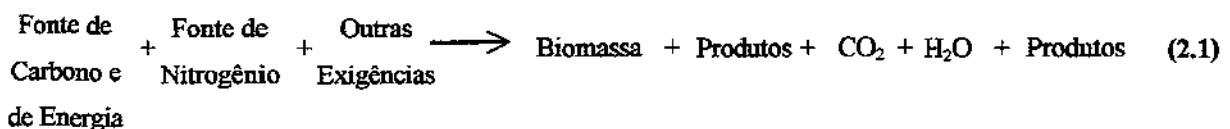
A otimização de uma fermentação envolve um grande número de fatores e o produto formado depende do material onde o microrganismo foi selecionado, do meio de cultivo utilizado e das condições de crescimento. Os microrganismos devem ser cultivados e motivados a formar o produto desejado em um biorreator contendo a composição do meio

de cultivo ótima para o microrganismo e os parâmetros de crescimento como temperatura e aeração devem ser controlados.

2. 1. 1. Meio de Cultivo

Uma investigação detalhada é necessária para estabelecer qual a melhor composição do meio de cultivo para um processo de fermentação específico, mas certamente as exigências básicas devem ser encontrados em qualquer meio. Todos os microrganismos requerem água, fontes de energia, carbono e nitrogênio, elementos minerais e possivelmente vitaminas mais o oxigênio, se for aeróbio. Em menor escala é relativamente simples dispor de um meio contendo compostos puros, mas o meio resultante, embora alcançando crescimento satisfatório, pode ser inviável para o uso em processo de escala industrial. Além do meio de cultivo, o crescimento de microrganismos e a formação de produtos podem ser influenciados pela variação de pH, formação de espuma, potencial de oxi-redução e pela forma morfológica do microrganismo (STANBURY & WHITAKER, 1984).

A formulação de um meio deve satisfazer as necessidades elementares para a produção de biomassa celular e metabólicos e também deve conter suprimento adequado de energia para a biossíntese e manutenção da célula. Através do balanço estequiométrico é possível calcular a quantidade mínima de nutrientes necessária para produzir uma determinada quantidade de biomassa ou produto. Para elaborar a composição do meio de cultivo a equação 2.1 (STANBURY & WHITAKER, 1984) baseada na estequiometria de crescimento e formação de produto deve ser considerada:



A água é o fator determinante em todos os processos biotecnológicos e na maioria dos casos é o maior componente dos meios de crescimento e cultivo de microrganismos, portanto, a qualidade da água é altamente relevante.

A energia para o crescimento dos microrganismos vem da oxidação dos componentes do meio ou da luz. É muito comum que os microrganismos utilizem a fonte de carbono (carboidratos, lipídeos e proteínas) como fonte de energia. O principal produto de um processo fermentativo freqüentemente determinará a escolha da fonte de carbono, particularmente se o produto resulta da dissimilação da mesma.

A maioria dos microrganismos pode utilizar a fonte de nitrogênio orgânica ou inorgânica. O nitrogênio inorgânico pode ser suprido como gás amônia, nitratos ou sais de amônio, e o nitrogênio orgânico pode ser suprido como aminoácidos, proteínas ou uréia. Na maioria dos casos o crescimento será mais rápido com o suprimento orgânico de nitrogênio.

Além do carbono e do nitrogênio, os microrganismos exigem macronutrientes para o seu metabolismo, como fósforo, cálcio, ferro, magnésio, potássio e enxofre; além dos microelementos como manganês, zinco, cobre e cobalto.

As condições em que se processam as fermentações também devem ser monitoradas e controladas. Os fatores mais importantes são a temperatura, o pH, a aeração e a agitação contínua do meio de cultivo (STANBURY & WHITAKER, 1984).

2. 1. 2. Microrganismo

As bactérias, os fungos e as leveduras tem notável poder de reprodução e por meio das diversas formas e agentes de contaminação, encontram-se amplamente distribuídos na natureza.

Xilanases tem sido isoladas a partir de fungos filamentosos, leveduras, bactérias e actinomicetos. A abundância de estudos sobre enzimas hemicelulolíticas produzidas por fungos filamentosos mostra que a maioria das xilanases possuem atividade catalítica a valores de pH neutro ou ácido, e a temperaturas abaixo de 45 °C. Por outro lado, bactérias são aptas a produzir enzimas xilanolíticas tolerantes a álcali, o que torna atrativo o uso deste microrganismo para tais aplicações.

2. 1. 2. 1. Bactérias

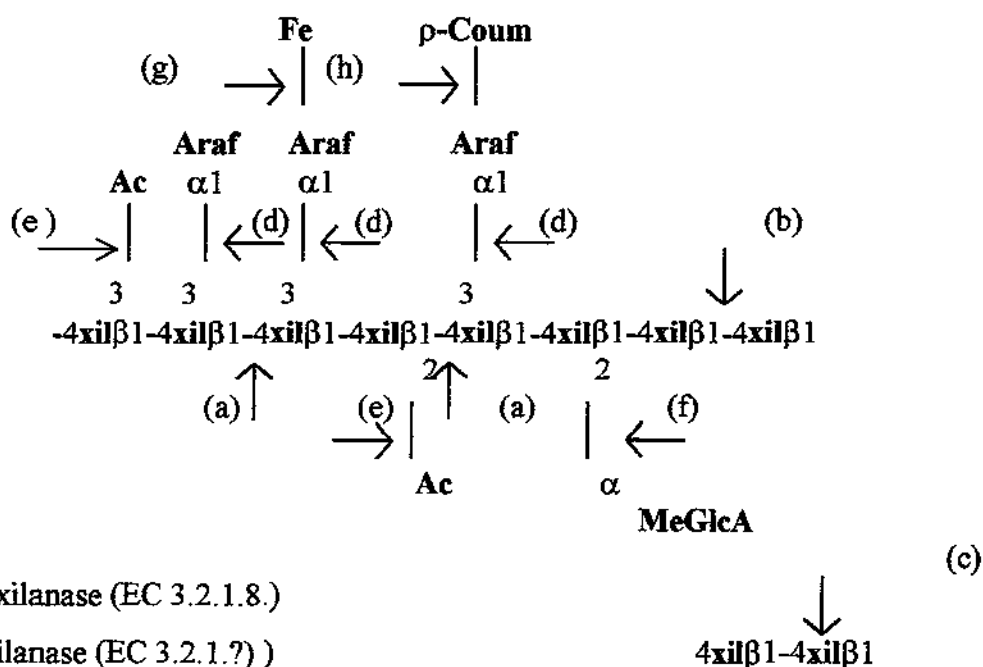
Existem centenas de gêneros e milhares de espécies de bactérias, englobando uma ampla faixa de propriedades morfológicas e estruturais. A maioria das bactérias apresentam uma forma simples, porém, algumas possuem arranjos nada usuais e são capazes de viver em condições ambientais extremas devido ao metabolismo particular que possuem. Algumas bactérias formam endosporos, as quais são altamente resistentes a desinfetantes, radiação e calor. As bactérias do gênero *Bacillus* são esporuladas, gram-positivas, aeróbias ou aeróbias facultativas e podem viver em solo, água, insetos, animais e humanos (PELCZAR *et al.*, 1993).

2. 1. 3. Degradação Enzimática de Xilanas

O sistema enzimático necessário para a degradação de xilanas consiste de uma mistura de endo e exo-enzimas. A estrutura da hemicelulose determina a composição do sistema xilanolítico necessário para sua total hidrólise (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993). A Figura 2.1 apresenta a estrutura da xilana, que mostra uma combinação de xilanas de gramíneas, de madeira mole e de madeira dura. As enzimas que hidrolisam a xilana podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal, (etapas a, b, c na Figura 2.1) e enzimas que degradam as cadeias laterais (etapas d, e, f, g, h na Figura 2.1). Formas múltiplas de cada classe de enzimas podem ocorrer e essas cooperam na hidrólise do substrato (WONG *et al.*, 1988).

A hidrólise da xilana por xilanases produz heteroxilo-oligossacarídeos que contém cadeias de arabinofuranose, ácido glicurônico ou ácido 4-O-metil-glicurônico. Enzimas, como as endo-(1,4)- β -D-xilanases, hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) dentro da cadeia de hemicelulose. Oligossacarídeos liberados desta hidrólise podem ser degradados por β -xilosidases. Exo-enzimas, do tipo α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidases e acetil(xilana) esterases, removem do polímero os substituintes arabinofuranosil, ácido glucopiranosídico e os grupos acetil, respectivamente (BIELY, 1985).

Endo-(1,4)- β -xilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. Elas rompem a cadeia de xilana ao acaso produzindo xilooligossacarídeos com um baixo grau de polimerização (BASTAWDE, 1992).



(a) Endo-1,4-xilanase (EC 3.2.1.8.)

(b) Exo-1,4-xilanase (EC 3.2.1.?))

(c) β -xilosidase

(d) α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)

(e) Acetilxilana esterase (EC 3.1.1.?)

(f) α -glucuronidase (EC 3.2.1.?)

(g) esterase de ácido felúrico (EC 3.1.1.?)

(h) esterase de ácido p -coumárico (EC 3.1.1.?)

Figura 2.1: Representação da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil; Araf, L-arabinofuranose; MeGlcA, ácido 4-O-metilglicurônico; Xyl, D-xilose; Fe, grupo feluroil; p -Coum, grupo p -coumaroil.

2. 1. 4. Produção de Xilanases por Bactérias

Xilanases tem sido isoladas a partir de bactérias que degradam hemicelulose, dentre estas *Bacillus subtilis*, *Bacteroides succinogene* e *Clostridium stercorarium* (KHANNA & GAURI, 1993). De acordo com SEWELL *et al.* (1988), o polímero xilana é eficientemente

degradado sob condições anaeróbias por outros gêneros bacterianos incluindo *Ruminococcus* e *Butyrivibrio*.

B. pumilus IPO, isolado do solo na Tailândia produziu endoxilanase extracelular (1,4- β -D-xilana xilanohidrolase [EC 3.2.1.8]). O pH e a temperatura ótima da xilanase produzida foram 6,5 e 40°C e a massa molar foi estimada em 24000 Da (PANBANGRED *et al.*, 1983).

Enzimas xilanolíticas tolerantes a álcali foram isoladas de *Bacillus sp* (OKAZAKI *et al.*, 1985). Atividade máxima e estabilidade foram encontradas a pH em torno de 10, enquanto a maioria das hemicelulases estudadas até então eram ativas a pH neutro ou ácido, sendo a temperatura para ótima atividade abaixo de 45°C.

Foi observado que o *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI produziu endoxilanase, β -xilosidase, acetilesterase arabinofuranosidase durante crescimento em xilana e xilose (LEE *et al.*, 1993). O complexo endoxilanase apresentou no mínimo 6 bandas de alta massa molar quando analisado por eletroforese. A endoxilanase foi purificada por filtração em gel e cromatografia de afinidade. A atividade específica da enzima foi de 41 U/mg, e o pH e temperatura ótimos foram respectivamente 6,0 e 70°C.

Bacillus stearothermophilus produziu xilanases e α -L-arabinofuranosidase extracelulares (BEZALEL *et al.*, 1993). A atividade xilanásica foi alta quando o crescimento se deu em presença de D-xilose; de outro modo, a atividade da arabinofuranosidase era alta quando o crescimento se dava em meio contendo L-arabinose.

DAHLBERG *et al.* (1993) estudaram a produção de enzimas xilanolíticas por *Rhodothermus marinus*. O crescimento em bioreator no meio contendo xilana a uma temperatura de 65°C, ocorreu a uma taxa específica de 0,43 h⁻¹. A concentração final de células foi de 4g/L (base seca), comparado a 2 g/L para células cultivadas na ausência de xilana. Ao menos duas enzimas xilanolíticas, endo-1,4- β -xilanase e 1,4- β -xilosidase, foram excretadas no meio de cultura quando as células foram cultivadas sobre xilana. A 90°C e

pH 7,0 o tempo de meia vida da endo-1,4- β -xilanase foi de 14 horas e da 1,4- β -xilosidase foi de 45 minutos.

Bacillus sp tipo TAR 1 produziu xilanase extracelular (NAKAMURA *et al.*, 1994), com atividade entre pH 5,0-9,5 a 50°C. Os pHs e temperaturas ótimos foram de 7,0 a 75°C e pH 9,0 a 70°C. A xilanase isolada apresentou massa molar de 40 kDa e ponto isoelétrico em pH 4,1. Os produtos predominantes da hidrólise da xilana foram xilobiose, xilotriose e oligossacarídeos maiores, mostrando que a enzima era endoxilanase. A produção da xilanase foi induzida pela presença de xilana e xilose, mas inibida por glicose.

KUBATA *et al.* (1994), isolaram xilanases do meio de cultura de *Aeromonas caviae* ME-1. Xilobiose foi o único produto da hidrólise da xilana de faia e de bétula. Em uma investigação prévia, os autores encontraram cinco xilanases distintas no sobrenadante da cultura desta bactéria. Três das cinco xilanases apresentaram alta atividade xilanásica enquanto outras duas exibiram menores picos de atividade da enzima.

A massa molar e o ponto isoelétrico da xilanase produzida por *Bacillus sp* cepa BP-23 foram estimados em 32 kDa e 9,3 (BLANCO *et al.*, 1995). A temperatura e o pH ótimos para máxima atividade xilanásica foram 50°C e 5,5 respectivamente. Os principais produtos da hidrólise de xilana de bétula foram xilotetraose e xilobiose.

Bacillus sp (V1-4) foi isolado de polpa Kraft de madeira dura (YANG *et al.*, 1995). Este microrganismo cresceu em licor marrom de polpa Kraft diluído a pH 11,5 e produziu 49 U ($\mu\text{mol xilose min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) de xilanase quando cultivado em meio alcalino a pH 9. O pH ótimo de atividade da enzima variou com o pH usado para cultivo do microrganismo e com o tampão usado para o ensaio. Quando o cultivo foi desenvolvido a pH 10 e o ensaio enzimático realizado com tampão glicina, a atividade máxima encontrada foi a pH 8,5; já com tampão fosfato, a atividade máxima foi entre pH 6 e 7. A temperatura ótima (a pH 7) foi 55°C.

A Tabela 2.2 apresenta uma listagem de bactérias produtoras de enzimas xilanolíticas, incluindo substratos estudados, massa molar, temperatura e pH ótimos, de acordo com a literatura.

Tabela 2.2: Bactérias produtoras de enzimas xilanolíticas descritas pela literatura.

Microorganismo	Substrato	Massa Molar (kDa)	T _{ótima} (°C)	pH _{ótimo}	Referência
<i>A. caviae</i>	xilana de faia e de bétula	nd*	nd*	nd*	KUBATA <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus sp</i>	xilana de bétula	32	50	5,5	BLANCO <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus sp</i>	nd*	48	75	9,0	GESSESSE, 1998
<i>Bacillus sp</i>	licor marrom de polpa Kraft	nd*	55	7,0	YANG <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus sp</i>	xilana e xilose	40	70	9,0	NAKAMURA <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus sp</i>	nd*	nd*	45	10	OKAZAKI <i>et al.</i> , 1985
<i>B. pumilus</i>	nd*	24	40	6,5	PANBANGRED <i>et al.</i> , 1983
<i>B. stearothermophilus</i>	D-xilose	nd*	nd*	nd*	BEZALEL <i>et al.</i> , 1993
<i>R. marinus</i>	xilana	nd*	90	7,0	DAHLBERG <i>et al.</i> , 1993
<i>T. saccharolyticum</i>	xilana e xilose	nd*	70	6,0	LEE <i>et al.</i> , 1993
<i>T. thermarum</i>	xilose e xilana de faia e de bétula	40-100	nd*	nd*	SUNNA <i>et al.</i> , 1996

* não determinado

O cultivo da bactéria *Thermotoga thermarum*, que é anaeróbia e extremamente termofílica, produziu endoxilanase, β -xilosidase e α -arabinofuranosidase (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1996). As enzimas produzidas foram ativas entre 40 e 100°C e a pH de

4,0 a 9,0. Quando xilana e xilose foram usadas como substrato, as endoxilanases produzidas apresentaram massa molar de 40 e 100 kDa. Houve um aumento significativo na concentração celular e na atividade de endoxilanase quando se substituiu xilana solúvel de bétula (birchwood) por xilana insolúvel de faia (beechwood).

Duas xilanases, denominadas XylA e XylB, foram purificadas do caldo de fermentação do *Bacillus* sp. cepa AR-009 (GESSESSE, 1998). A massa molar das duas enzimas foram estimadas por eletroforese em 23 kDa (XylA) e 48 kDa (XylB). O pH ótimo foi 9 para XylA e 9 a 10 para XylB. A temperatura ótima para XylA foi 60°C a pH 9 e 70°C a pH 8, e para XylB foi 75°C a pH 9 e 70°C a pH 8.

B. pumilus produziu 130 U/ml de xilanase em meio contendo xilana de bétula. A enzima demonstrou-se ativa nas condições apropriadas para aplicação em processos de branqueamento de polpa de papel, pH 9 e 55 °C. (TAGLIARI *et al.*, 1998).

2. 1. 5. Otimização por Planejamento Experimental

Os planejamentos fatoriais foram introduzidos por G. E. P. Box na década de 1950. Sua aplicação vem crescendo exponencialmente desde a revolução da informática e a facilidade do uso de softwares para análises estatísticas (BARROS *et al.*, 1995).

Atualmente, a necessidade de minimizar custos vem incentivando engenheiros de processos a analisar previamente as implantações de sistemas, com o objetivo de determinar faixas de operação que continuem garantindo um bom rendimento sem prejuízos na produtividade, situação esta imprescindível para a viabilidade de um processo. Em processos biotecnológicos geralmente é observada a influência de muitas variáveis, onde a importância de cada uma deve ser determinada. Portanto, a otimização baseada no planejamento experimental é uma ferramenta de trabalho muito útil para melhor compreensão do sistema (MEDEIROS, 1999).

Este método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada, executando-se experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para n variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que devem ser realizados para investigar todas as possíveis combinações é igual a 2^n (BOX *et al.*, 1978).

Com os resultados obtidos do planejamento é possível avaliar os efeitos principais e de interações das variáveis sobre a resposta, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear ou de primeira ordem. Se o modelo de primeira ordem não apresentar boa correlação com os dados experimentais, é possível completar o planejamento fatorial inicial realizando-se mais $2n$ ensaios de acordo com a configuração "estrela", para obter um modelo quadrático ou de segunda ordem. A condição correspondente à intermediária entre os dois níveis (+1 e -1) atribuída a cada variável é denominada nível zero ou ponto central. A realização de experimentos nestas condições permite a estimativa do erro experimental associado aos ensaios, muito importante para verificar o quão reprodutivo é o processo estudado.

Esta metodologia é útil para uma redução no número de experimentos práticos a serem realizados, minimizando tempo e custos operacionais, além de se obter uma análise mais racional dos resultados baseada nas probabilidades estatísticas.

O meio de cultivo para produção de xilanases por *Schizophyllum commune* foi otimizado utilizando a metodologia de planejamento estatístico e superfície de resposta (HALTRICH *et al.*, 1993). Foram investigadas as concentrações de avicel, extrato de levedura e nitrato de amônio e a composição otimizada foi 73,4 g/L; 55,4 g/L e 1,38 g/L respectivamente. Quando o microrganismo foi cultivado em frascos agitados no meio otimizado, foi obtida uma produção de 5,74 U/mL em 11 dias.

2. 2. Aplicação Industrial de Xilanases

O grande interesse na produção de xilanases está relacionado à vasta aplicação que esta enzima possui no setor industrial, abrangendo desde a substituição de etapas de processos correntes até o estabelecimento de outros inteiramente novos.

A aplicação de xilanases se divide em duas categorias: uma, livre de celulasas e a outra com uso associado de polissacaridasas (BIELY, 1985). Como exemplo da primeira categoria, tem-se o uso de xilanases nas indústrias têxteis e de papel e celulose. Por outro lado, a associação de xilanases, celulasas e pectinases se aplica a indústrias de alimentos.

2. 2. 1. Aplicação de Xilanases em Branqueamento de Polpas de Papel

Face às pressões legislativas ambientais, as indústrias de papel e celulose estão modificando o processo de branqueamento da polpa, bem como as tecnologias do tratamento de seus efluentes visando reduzir os impactos ambientais (WONG & SADDLER, 1992). A aplicação mais promissora de xilanases é no pré-branqueamento de polpas Kraft, onde estas teriam a função de facilitar a ação dos agentes químicos na remoção dos resíduos de lignina da polpa lavada. A aplicação biotecnológica potencial de xilanases na polpa de madeira e nas indústrias de papel foi revisada por vários autores, dentre eles BOURBONNAIS *et al.* (1991), ERIKSSON (1991), VIIKARI *et al.* (1991 e 1994), DANEULT *et al.* (1994) e DURAN *et al.* (1995).

2. 2. 1. 1. Características Necessárias para Aplicação Industrial de Xilanases

Para que seja viável a aplicação industrial de xilanases em branqueamento de polpa de papel alguns critérios devem ser observados (SAMAIN *et al.*, 1997):

- O caldo enzimático não deve apresentar atividade celulásica para evitar a hidrólise das fibras de celulose.

- A massa molar da enzima deve ser baixa para facilitar sua difusão nas fibras da polpa.
- A enzima deve ser estável e ativa a alta temperatura (acima de 45°) e pH alcalino.
- A enzima deve ser obtida com alta produtividade e baixo custo.

2. 2. 1. 2. Branqueamento Convencional de Polpas Kraft

Para a obtenção de uma polpa de celulose pura, apropriada para a fabricação de papel, tradicionalmente são necessários dois estágios: cozimento e branqueamento. O processo de cozimento mais importante é o Kraft. Sob condições de alta temperatura e pressão, 90 a 95% da lignina original é modificada ou solubilizada, o conteúdo de hemiceluloses é modificado e as fibras se separam. A xilana é dissolvida no licor de cozimento devido a alta temperatura e pH. Entretanto, à medida que o processo vai ocorrendo a alcalinidade diminui e a xilana degradada precipita-se de uma forma mais ou menos cristalina sobre a celulose (BUCHERT et al., 1992). Neste estágio as fibras são escuras, principalmente porque ainda contém lignina (3-5%), condensada durante o cozimento. A cor marrom das polpas é devido a várias substâncias que absorvem a luz visível. Subseqüentes branqueamentos são necessários para removê-las e com isso elevar a alvura da polpa (VIIKARI et al., 1991b).

Ambas as etapas, cozimento e branqueamento, estão intimamente ligadas, já que uma pasta bem deslignificada requer uma quantidade menor de reagentes no branqueamento. Contudo, uma alta deslignificação da polpa pode comprometer as propriedades físicas do material, em virtude de degradações indesejáveis durante o cozimento.

O branqueamento pode ser definido como um tratamento que tem por objetivo melhorar as propriedades da pasta celulósica, resultando um grau de alvura elevado e estável. O branqueamento envolve, em geral, duas etapas: remoção da lignina residual (oxidação, cloração, etc.) e modificação das substâncias coloridas da pasta (hipocloração, peroxidação, etc.). Deve-se empregar um tratamento que promova um equilíbrio entre a

alvura desejada para o material e os valores especificados para as propriedades físicas do mesmo. Os parâmetros usuais que medem a eficiência do branqueamento são:

- **Alvura:** Analisa as propriedades ópticas da pasta relacionadas com a absorção ou reflexão da luz.
- **Nº Kappa:** representa a medida do teor de lignina residual da polpa, avaliando a eficácia da deslignificação. É o número de mililitros de uma solução de KMnO_4 0,1 N consumida por 1 g de celulose seca. Os resultados são corrigidos para dar um consumo de 50% de permanganato em contato com o corpo de prova.
- **Viscosidade:** Avalia a degradação sofrida pelos carboidratos durante o processo.

O branqueamento é usualmente executado em seqüências bem definidas utilizando reagentes específicos para cada uma com estágios de lavagem entre elas. A Tabela 2.3 apresenta os tratamentos empregados com maior freqüência.

Tabela 2.3: Etapas frequentemente utilizadas em processos de branqueamento

Simbologia	Significado	Tratamento
O	Oxigenação	Reação com oxigênio elementar à alta pressão em meio alcalino.
C	Cloração	Reação com cloro elementar em meio ácido. Seu objetivo é de deslignificar a polpa.
D	Dióxido de Cloro	Reação com dióxido de cloro em meio ácido.
E	Extração alcalina	Dissolução dos produtos da reação com hidróxido de sódio. Visa a remoção dos componentes coloridos da pasta celulósica
P	Peroxidação	Reação com peróxidos em meio alcalino.

Diversas seqüências de tratamento podem ser escolhidas para compor o processo de branqueamento de polpas Kraft. O processo utilizado pela Champion Papel e Celulose LTDA está descrito a seguir e ilustrado na Figura 2.2.

Matéria-Prima Fibrosa: *Eucalyptus grandis* (8 anos de idade)

- densidade básica da madeira 470-520 kg seco/m³
- $\left\{ \begin{array}{l} \text{celulose - 70\%} \left\{ \begin{array}{l} \alpha - \text{celulose 83\%} \\ \beta \text{ e } \gamma - \text{celulose 18 - 20\%} \end{array} \right. \\ \text{lignina - 25\%} \\ \text{extrativos - 4\%} \\ \text{cinzas - 1\%} \end{array} \right.$

Cozimento: cozinhador contínuo “ESCO”

- tempo de retenção: 70 minutos
- temperatura: 173°C
- carga de álcali: 17% álcali ativo como Na₂O/madeira seca
- relação licor/madeira: 3,0L/kg madeira seca
- fator H: 1000
- viscosidade polpa marrom: > 45cp
- alcali ativo residual: 5-7g/L
- teor de rejeitos: < 3%
- Kappa após cozimento: 15

Deslignificação com Oxigênio (O):

- temperatura: 93-96°C
- tempo: 90 minutos
- oxigênio aplicado: 15-20 kg/ton
- soda: 1:1 c/ O₂
- Kappa após a deslignificação: 10
- consistência 10%
- pH após lavagem: 10

Redução do Kappa entre Cozimento e Deslignificação com O₂: 5 unidades

2. 2. 1. 3. Branqueamento Enzimático

O branqueamento de polpas Kraft usando uma combinação de cloração e extração alcalina foi praticada por muitos anos. Infelizmente os efluentes destes estágios não podem ser reciclados e permanecem com grande quantidade de compostos organoclorados, os quais são conhecidos pelos efeitos tóxicos, mutagênicos e cancerígenos. Novas tecnologias de branqueamento tem sido pesquisadas para reduzir ou eliminar o uso do cloro elementar nos processos de branqueamento (DANEALT *et al.*, 1994).

O uso de enzimas para aumentar a delignificação de polpas foi inicialmente sugerido por VIIKARI *et al.* (1986). De acordo com YANG *et al.* (1992), a introdução de xilanases como um estágio de branqueamento de polpas Kraft melhora a branqueabilidade nas etapas subsequentes do processo.

Xilanases de *Trichoderma* spp têm sido usadas para estudos de branqueamento. Em experimentos de laboratório realizados pela Novo Laboratórios Ltda., a redução do cloro necessário durante estágios de cloração de madeira dura foi na faixa de 35% a 41% e de madeira mole, na faixa de 10% a 26% (WONG & SADDLER, 1992). Estes pré-tratamentos foram realizados utilizando de 1 a 5 Kg de enzima comercial para cada tonelada de polpa seca, com tempos de incubação de 0,5 a 3 horas.

Xilanases produzidas por *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* foram usadas no pré-branqueamento de polpas de madeira mole e madeira dura (TREMBLAY & ARCHIBALD, 1993). O pré-branqueamento teve maiores efeitos na madeira dura, diminuindo em 22% o consumo de Cl_2 e reduzindo em mais de 50% os resíduos organoclorados no efluente.

MILAGRES (1994) aplicou xilanases de *Penicillium janthinellum* em branqueamento de polpa Kraft de eucalipto (madeira dura). O número Kappa e a viscosidade da polpa antes do branqueamento eram 15,2 e 31,1 respectivamente. A Tabela 2.4 apresenta os resultados obtidos com 5 seqüências diferentes de branqueamento.

Tabela 2.4: Resultados de branqueamento (MILAGRES, 1994)

SEQÜÊNCIA	O	OX	XO	XOPE _{OP} DP	OXPE _{OP}
Nº KAPPA	11,7	10,9	10,0	10,2	9,6
VISCOSIDADE	25,0	25,5	22,7	18,3	19,6

De acordo com BOCCHINI *et al.* (1997), o tratamento de polpas Kraft de eucalipto (madeira dura) com xilanases alcalinas de *Bacillus sp.* seguido de um branqueamento (D-E) resultou em um decréscimo de 23% na taxa de cloro usada na deslignificação da polpa. Foi observado a redução de uma unidade no número Kappa em relação a pasta não tratada com a enzima (Tabela 2.5). Esta mesma redução também foi observada na polpa tratada com xilanase sem branqueamento químico posterior (de 13,85 para 12,80).

Tabela 2.5: Resultados de branqueamento (BOCCHINI *et al.*, 1997)

SEQÜÊNCIA	Nº KAPPA	% ALVURA
DE (sem tratamento enzimático)	2,70	56,5
X DE (com 23% a menos de ClO ₂)	1,70	60,0

De acordo com ARAÚJO *et al.* (1997), a aplicação da xilanase comercial Pulpzyme HC (Novo Nordisk) em branqueamento TCF (Totally Chlorine Free) de polpas Kraft de madeira mole, resultou em uma redução do número Kappa de 5,6 (controle sem o tratamento enzimático) para 5,1 (Tabela 2.6). A alvura aumentou de 64,1% para 69,0% quando o tratamento enzimático foi aplicado.

Tabela 2.6: Resultados de branqueamento (ARAÚJO *et al.* 1997)

SEQÜÊNCIA	Nº KAPPA	ALVURA
O-A-E _{OP} (sem tratamento enzimático)	5,6	64,1
O-X-A-E _{OP}	5,1	69,0

Dentre as preparações comerciais de xilanases indicadas para tratamento da polpa de madeira, três são produzidas a partir de *Trichoderma spp* modificada geneticamente: Pulpzyme HA (Novo Laboratórios Ltd.) de *T. reesei* ; Albazyme (Cultor Ltd.) e Ecopulp (Alko Ltd.) de *T. longibrachiatum* (WONG & SADDLER, 1992). A Tabela 2.7 apresenta uma lista de fornecedores comerciais de xilanases usadas em branqueamento de polpas de papel.

Tabela 2.7: Fornecedores industriais de xilanases

FORNECEDOR	PRODUTO
Clariant, UK	Catarzyme HS10, HT, SR 10, OS 10, NS 10 e MP
Genencor, Finlândia	Irgazyme 40-4X
Voest Alpine, Austria	VAI Xylanase
Novo Nordisk, Dinamarca	Pulpzyme HÁ, HB e HC
Biocon India, Bangalore	Bleachzyme F
Rohn Enzyme OU, Finlândia	Ecopulp X-100, X-200, X-200/4, TX-100, TX-200 e XM
Solvay Interlox, EUA	Optipulp L-8000
Thomas Swan Co., UK	Ecozyme
Iogen Corp., Canada	GS-35 e HS-70

Fonte: BAJPAI, 1999

Desde maio de 1997, uma indústria de papel e celulose canadense (Weyerhaeuser Pulp and Paper Mill) está utilizando o tratamento enzimático com xilanase de *Trichoderma* modificada geneticamente (BioBrite™ HB60C) nas etapas de branqueamento. O uso dessa enzima possibilitou a redução de 8,2% no consumo de ClO_2 e 21% no consumo de NaOH significando numa economia de 7,8% no custo total dos reagentes químicos do branqueamento.

a) Mecanismos de Ação

O mecanismo através do qual as xilanases atuam sobre a polpa ainda não está totalmente esclarecido. Existem algumas teorias que tentam explicar a redução dos níveis de cloro usado no branqueamento através da hidrólise da xilana.

Uma delas sustenta que a hidrólise da xilana dentro da parede celular resultaria na formação de microporos, promovendo um aumento na área específica da polpa e, conseqüentemente, maior acessibilidade aos agentes de branqueamento (NOE *et al.*, 1986).

Segundo outra teoria (Figura 2.3-A), as xilanases teriam a função de remover a xilana que estaria reprecipitada na superfície da polpa em razão da redução da alcalinidade no cozimento e das obtenções de valores de pH abaixo de 13. A remoção desta xilana aumentaria a permeabilidade da fibra e a acessibilidade dos reagentes às ligninas (VIIKARI *et al.*, 1991b; KANTELINEN *et al.*, 1993). Entretanto, em trabalho recente com polpas de madeiras duras e moles, mostrou-se que, com xilanases (ácidas) de *Trichoderma reesei* (não valendo a generalização para outras xilanases), a concentração de enzimas, acima de certos valores, não afeta a deslignificação, chegando sempre a uma concentração limite de 20%. Aparentemente, com estas xilanases, o fato se dá devido a uma limitação de acessibilidade aos substratos (VIIKARI *et al.*, 1994).

Uma terceira teoria (Figura 2.3-B) se baseia em estudos estruturais. Sugere-se que, estando a lignina ligada a polissacarídeos através dos complexos lignina-carboidratos e que algumas das ligações em tais complexos são álcali-resistentes, não se daria a hidrólise destas últimas durante o cozimento Kraft. Conseqüentemente, algumas ligninas residuais permaneceriam ligadas à hemicelulose após o cozimento (BUCHERT *et al.*, 1992 e 1993). Nesta teoria, o tratamento enzimático hidrolisaria a xilana a pequenos fragmentos, permitindo que a lignina associada a essas pequenas cadeias de hemicelulose fosse mais facilmente removida nas extrações subsequentes (PAICE *et al.*, 1992).

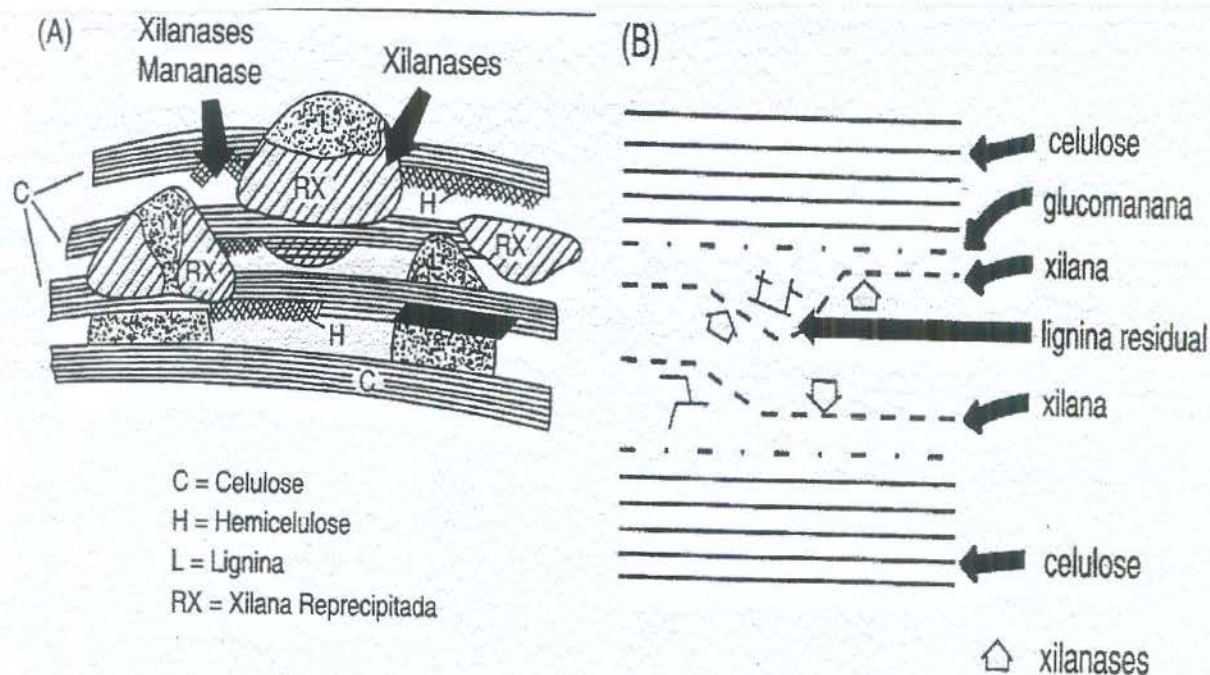


Figura 2.3: Mecanismos de atuação da xilanase.

(A) Proposto por Viikari *et al.*, 1991. (B) Proposto por Paice *et al.*, 1992.

b) Efeitos do Tratamento Enzimático no Branqueamento de Polpas Kraft

Estudos recentes mostram que o tratamento de polpas Kraft com xilanases reduz a quantidade de cloro no processo de branqueamento e ainda conserva alta alvura e boas propriedades da polpa.

⇒ EFEITO NA ADIÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS:

De acordo com CHAUVET *et al.* (1987), a aplicação da xilanase na sequência CEDED (Tabela 2.8), resultou uma significativa redução no consumo de agentes químicos com alta alvura. Em estudos recentes, TOLAN e CANOVAS (1992) observaram que a polpa tratada com xilanase antes da sequência (D₅₀C₅₀)(E₀)DED apresentou alvura 90% ISO com 16 % a menos de cloro ativo.

Tabela 2.8: Efeito do tratamento com xilanase na sequência convencional CEDED.

Etapa do Processo	Análise	Madeira Mole		Madeira Dura	
		Padrão	Tratada com Xilanase	Padrão	Tratada com Xilanase
Polpa	Kappa	32,5	29,0	24,0	20,6
Cloro	% Cloro	98,4	95,1	95,9	91,9
	% Alvura	25,3	29,0	49,6	49,9
Extração NaOH	Kappa	4,43	3,3	nd.*	nd.*
	% Alvura	34,7	42,5	51,9	56,0
Dióxido de cloro	% ClO ₂	99,7	94,0	89,5	84,4
	% Alvura	72,7	81,7	85,8	86,9
Extração NaOH	Kappa	1,29	0,74	nd.*	nd.*
	% Alvura	70,0	80,0	81,8	83,9
Dióxido de cloro	% ClO ₂	90,0	87,0	89,5	84,4
	Kappa	0,5	0,41	nd.*	nd.*
	% Alvura	88,0	90,6	90,8	90,9

Fonte: CHAUVET *et al.*, 1987

* não determinado

⇒ EFEITO NAS PROPRIEDADES DA POLPA

Um aumento na viscosidade foi verificado (SENIOR *et al.*, 1992 e YANG *et al.*, 1993) como resultado do tratamento enzimático, após subsequente branqueamento. Contudo, a presença de atividade celulásica afetava negativamente a viscosidade da polpa. De acordo com YANG *et al.* (1992), a sequência de branqueamento mais apropriada para polpas de madeira mole foi a OXPDP. Utilizando esta sequência a viscosidade da polpa foi aumentada (quando comparada com o controle sem tratamento enzimático) de 14,9 mPa.s para 16,3 mPa.s.

Xilanases de *Bacillus stearothermophilus* Y-6 eliminaram parcialmente as ligninas de madeira mole a 65 °C e pH 9, sem perdas na viscosidade da polpa (SHOHAM *et al.*, 1992).

⇒ EFEITO NOS EFLUENTES DE BRANQUEAMENTO

A diminuição da carga de cloro no branqueamento devido ao tratamento enzimático tem reduzido também o AOX (halogênio orgânico adsorvível) nos efluentes desse processo (SENIOR & HAMILTON, 1992). A necessidade de cloro no pré-branqueamento tem sido reduzida até 20 a 30 % quando o tratamento enzimático é aplicado. A economia de agentes químicos clorados para um branqueamento completo é geralmente a metade deste valor. Como resultado, a carga de AOX no efluente de branqueamento tem mostrado uma redução de 15 a 20 % (KOPONEN, 1991).

c) Fatores que Afetam a Eficiência do Tratamento Enzimático

Enzimas são proteínas com propriedades catalíticas específicas. As condições para atuação são diferentes para cada enzima (Tabela 2.9). Os principais fatores que afetam a eficiência do tratamento enzimático incluem a temperatura, o pH, a dosagem e a dispersão da enzima, consistência e o tempo de reação (DANEULT *et al.*, 1994):

- pH ótimo para o tratamento com xilanase varia de acordo com a enzima. Geralmente, as xilanases de origem bacteriana são mais efetivas na faixa de pH entre 6 e 9, enquanto as de origem fúngica atuam melhor a pH entre 4 e 6. A temperatura ótima varia entre 30 e 60 °C.
- Para obter melhores resultados do uso da enzima, a dosagem deve ser otimizada para cada caso. Em geral, a dosagem enzimática ótima varia na faixa entre 2 e 5 unidades (U) por grama de polpa seca.
- A consistência da polpa também deve ser otimizada para obter uma dispersão efetiva da enzima e aumentar a eficiência do tratamento enzimático.

Para a maioria dos branqueamentos descritos, o efeito desejado pode ser obtido após somente uma hora de tratamento enzimático, contudo o efeito da enzima continua lentamente até 18 horas de tratamento (TOLAN & CANOVAS, 1992). Usualmente o tempo de reação é fixado em duas horas. Contudo, um longo tempo de retenção deve ser evitado se celulasas estiverem presentes.

Pesquisas recentes estão sendo realizadas na área de produção de xilanases, principalmente na preparação de xilanases ativas a altas temperaturas e pH alcalino, favorecendo o uso da enzima nos diversos estágios e condições do processo de branqueamento (Bim *et al.*, 1999).

Tabela 2.9: Condições de operação para branqueamento com xilanases.

Referências	Carga (U/g)	Consistência (%)	pH	Tempo (h)	T (°C)
Viikari <i>et al.</i> , 1987	nd.*	2,5	5,0	24,0	45
Pommier, 1990	15	4	4,8	0,5	50
Koponen, 1991	nd.*	nd.*	4,0-7,0	1,0-3,0	50-70
Senior e Hamilton, 1992	5	6	5,5-6,0	2,0	50
Skerker <i>et al.</i> , 1992	nd.*	2,5-12	4,0-8,0	0,5-3,0	40-65
Tolan, 1992	1	10	7,0-7,8	2,0	50
Tolan e Canovas, 1992	1-5	10	4,8	16,0	50
Turner <i>et al.</i> , 1992	0,5-2	8	3,5-5,0	0,5	30-55
Yang <i>et al.</i> , 1992	2	10	5,0	1,5	50
Senior e Hamilton, 1993	5	12	5,5-6,5	2,0	50
Milagres, 1994	10	10	5,5	3,0	40
Bocchini <i>et al.</i> , 1997	13,5	10	5,6	4,0	60
Condições de operação recomendadas para tratamento com xilanase	Madeira Dura 1-3	Maior que 3	Enz. Fúngicas 4,0-6,0	Menor que 3	40-60
	Madeira Mole 5-8	Ótimo 5-10	Enz. Bacter. 6,0-9,0	Ótimo 1,0-2,0	

* não determinado

2. 2. 2. Outras Aplicações de Xilanases

O uso de xilanases também foi proposto para clarificação de sucos e vinhos (BECK & SCOTT, 1974; BIELY, 1985, 1991), para extração de café, óleos vegetais e amido (BIELY, 1991), para melhorar as propriedades nutricionais de grãos armazenados (LINKO *et al.*, 1989), para maceração da parede celular de vegetais (BECK & SCOTT, 1974), e para fornecer diferentes texturas a produtos de panificação (McCLEARY, 1986). Muitas dessas aplicações não requerem xilanases purificadas, e a presença de celulases e/ou pectinases são freqüentemente desejáveis. Algumas delas já estão em uso (WONG e SADDLER, 1992).

De acordo com WONG e SADDLER (1992), com exceção da conversão de xilose a xilitol, a bioconversão de material lignocelulósico a açúcares fermentescíveis parece não ser economicamente viável devido a outras fontes mais competitivas tais como amido e sacarose. Entretanto, a acumulação massiva de resíduos da agricultura está criando um grande volume de estoque de alimentos de baixo valor. Uma alternativa que tem sido considerada é a bioconversão para produzir etanol, proteína celular, enzimas, e outros materiais químicos ricos em xilana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Materiais

3. 1. 1. Microrganismo

O microrganismo foi selecionado em um trabalho anterior, onde foram investigadas mais de 500 colônias isoladas do solo e de madeira em decomposição (DUARTE *et al.*, 1999). Este microrganismo foi selecionado em meio alcalino e identificado como *Bacillus pumilus* pela “Fundação Tropical André Tosello”.

3. 1. 2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com a exceção da xilana (Sigma - X-0502, de “birchwood”), de grau técnico.

3. 1. 3. Meios de Cultivo

a) Meio de Manutenção do Microrganismo

- xilana de bétula "birchwood" 15 g/L
- extrato de levedura 1,0 g/L
- peptona 1,0 g/L
- K_2HPO_4 1,0 g/L
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L
- ágar-ágar 20 g/L
- pH foi ajustado para 10,0 pela adição de NaOH 2 N.

b) Meio de Cultivo Inicial (MANDELS E STENBERG, 1976)

Xilana de bétula	1%
Peptona	0,1%
Tween80	0,1%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4g/L
KH_2PO_4	2,0g/L
Uréia	0,3g/L
CaCl_2	0,3g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,6mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,4mg/L
CoCl_2	2,0mg/L

O pH foi ajustado para 10 com NaOH 2N e o volume completado com água.

3. 2. Métodos**3. 2. 1. Métodos de Cultivo****a) Preservação e Repique do Microrganismo**

O microrganismo foi preservado em meio sólido inclinado contendo xilana . A manutenção das culturas microbianas foi realizada por repicagem periódica no meio, seguido de incubação a 40° C até crescimento (aproximadamente 48 horas), e de estocagem sob refrigeração a 5°C.

b) Preparo do Inóculo

Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo inicial contendo xilana de bétula (descrito no item 3.1.3.b), foram inoculados com o

microrganismo oriundo do meio de manutenção e foram mantidos sob agitação de 230 rpm e 40°C durante 20 horas.

O inóculo foi padronizado por densidade óptica, que foi confirmada por contagem de células em placas. A densidade óptica foi medida em porcentagem de Transmitância (% T) no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro GBC UV/VIS 911A e mantida a 4% T contra branco com água. A contagem de células foi feita através de um plaqueamento por diluição em série (até 10^{-9}). O microrganismo cresceu a 40°C por 24 horas em meio Ágar Nutriente.

c) Produção da Enzima

O estudo de otimização da produção de xilanases foi desenvolvido em frascos agitados (shaker) a 230 rpm. A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers com capacidade para 50 mL, contendo 2 mL do inóculo e 10 mL do meio de cultivo a ser investigado conforme planejamentos descritos no item 3.2.2.

O fermentador Bioflow III (New Brunswick Scientific Co, NJ, USA) foi utilizado para produção de 2L da enzima, quantidade suficiente para a aplicação da mesma em branqueamento de polpas de papel. A composição do meio de cultivo em frascos agitados que resultou em maior atividade enzimática foi utilizada para esta fermentação. A temperatura foi mantida em 40°C, a demanda de oxigênio em 50% e a fração de inóculo utilizada foi de 20%.

d) Centrifugação

A centrifugação foi realizada a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

3. 2. 2. Ensaios de Otimização da Produção de Xilanases

Neste estudo os ensaios foram realizados segundo planejamentos experimentais fatoriais (HAALAND, 1989 e BARROS *et al.*, 1995).

a) Primeiro Planejamento (2^{6-2})

Inicialmente foi realizado um planejamento experimental fatorial fracionário de 6 fatores em dois níveis (nível -1 e nível +1), com 4 repetições do ponto central e resolução IV, totalizando 20 ensaios distintos. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da concentração de xilana na faixa de 0,5 a 8% (fonte de carbono), da concentração de peptona na faixa de 0,05 a 1% (fonte de nitrogênio orgânica), da concentração de sulfato de amônio na faixa de 0,07 a 1% (fonte de nitrogênio inorgânica), da concentração de fosfato de potássio na faixa de 0,1 a 0,4%, da temperatura na faixa entre 35 e 45°C e do pH inicial do meio de cultivo entre 8,5 e 10,5 sobre a produção de xilanases. A resposta avaliada foi a atividade xilanásica (a 45°C e pH 10) após 24 horas de fermentação. Foram utilizadas ferramentas matemáticas e gráficas disponíveis no programa “STATISTICA”.

b) Segundo Planejamento (2^{4-1})

Um segundo planejamento experimental fracionário foi realizado com o objetivo de estudar possíveis mudanças nos efeitos das variáveis sobre a produção de xilanase, visto que novas faixas de estudo foram estabelecidas para alguns fatores no primeiro planejamento. Foram estudadas a concentração de xilana (na faixa de 1 a 5%), a concentração de peptona (entre 0,1 e 1,1%), a concentração de sulfato de amônio (na faixa de 0,05 a 0,25%) e o pH inicial do meio de cultivo (entre 8,5 e 10,5). Estas variáveis foram estudadas em dois níveis com 4 pontos centrais e resolução III, totalizando 12 ensaios distintos. A resposta avaliada foi a atividade xilanásica ao longo da fermentação a 40°C, nas condições ótimas da enzima (55°C e pH 9).

3.2.3. Ensaios Complementares

Com o objetivo de aprofundar o estudo da produção de xilanases alcalinas por *B. pumillus* foram monitorados o crescimento celular, o consumo de substrato e o comportamento do pH, além da atividade xilanásica ao longo da produção da enzima.

3. 2. 4. Ensaios de Branqueamento da Polpa Kraft com Xilanases

A polpa Kraft utilizada no tratamento enzimático originou-se de *Eucalyptus grandis* ("hardwood") e foi gentilmente cedida pela Champion Papel e Celulose LTDA (Mogi-Guaçu, SP). A polpa, proveniente do estágio de deslignificação com oxigênio, apresentou consistência de 17,9%, 41,0 cP de viscosidade, número Kappa de 10,5 e 49,2% de alvura. A polpa foi branqueada com a enzima produzida por *B. pumilus* neste trabalho e com a xilanase comercial Pulpzyme (NovoNordisk). A Figura 3.1 apresenta o local da sequência de branqueamento onde foram aplicadas as xilanases. A etapa de branqueamento químico não foi realizada.

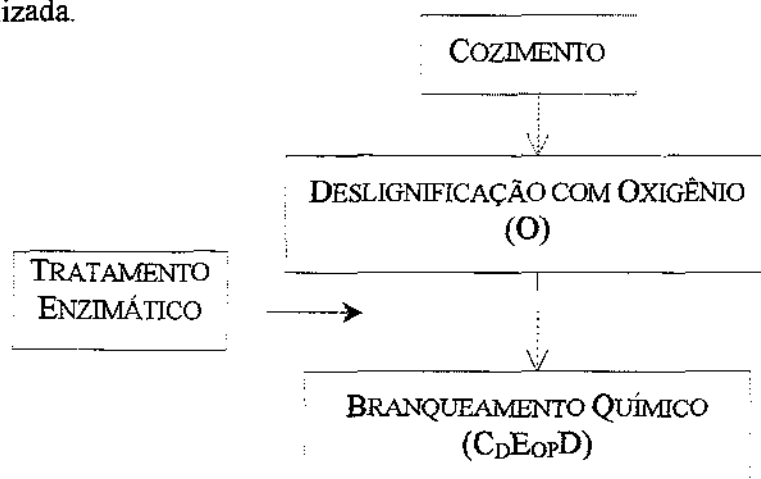


Figura 3.1: Sequência de branqueamento incluindo o tratamento enzimático

Para cada teste foram usadas 10 g de polpa seca e sua consistência foi ajustada a 10% com a adição de tampão glicina-NaOH 0,1M e pH 9,0. A enzima foi adicionada e a mistura foi colocada em sacos de polietileno, homogeneizada e incubada em banho termostático. Essa mistura foi submetida a agitação manual a cada 15 minutos e no final da aplicação, foi filtrada à vácuo em funil de Büchner. A massa retida foi utilizada para confecção das folhas de papel. A Tabela 3.1 apresenta as condições investigadas.

Tabela 3.1: Condições do tratamento enzimático

Enzima	Dosagem (U/g de polpa seca)	Consistência (%)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	pH
Pulpzyme (comercial)	5 e 25	10	3	60	8,0
Xilanase (<i>B. pumillus</i>)	5, 20 e 50	10	2	50	9,0

3. 2. 5. Métodos Analíticos

a) Determinação da Atividade Xilanásica

A atividade xilanásica foi determinada pela quantificação de açúcares redutores totais liberados a partir de xilana, de acordo com o método de BAILEY *et al.* (1992), modificado para pH 9 e 10. Os açúcares redutores foram dosados pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959).

A solução de xilana foi preparada dissolvendo 1g de xilana de bétula (birchwood) em 80mL de tampão Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9 e 10. A solução foi aquecida até ebulição, e após retornar a temperatura ambiente o volume foi ajustado para 100 mL com o referido tampão.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se 1,06 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico; 1,98g de hidróxido de sódio; 30,60 g de tartarato de sódio e potássio e 0,83 g de bissulfito de sódio em 1L de água destilada. A mistura foi agitada até total dissolução dos reagentes e a seguir foram adicionados 0,76 mL de fenol e o volume foi completado para 140 mL com água destilada.

Ensaio: Uma alíquota de 0,9 mL de xilana foi colocada em tubos de ensaio e incubada em banho termostatizado. Foram adicionados 100 µL da enzima diluída apropriadamente em tampão, incubando-se por mais 5 minutos. A seguir, 1,5 mL do reagente DNS foi adicionado e a mistura reagiu durante 5 minutos em água em ebulição. A interrupção da reação foi feita por resfriamento dos tubos em banho de gelo, e a absorbância lida a 540 nm em espectrofotômetro GBC UV/VIS 911A.

O aparelho foi calibrado substituindo a enzima por tampão (spectro zero). Um branco onde a enzima foi adicionada após o reagente DNS e imediatamente fervida foi utilizado simultaneamente à cada amostra, detectando-se assim, todas as unidades redutoras não provenientes da hidrólise da xilana (branco da enzima).

A curva padrão foi estabelecida com solução de xilose, nas concentrações entre 2 e 10 $\mu\text{mol/mL}$.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade desta necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor (expresso como xilose) por minuto nas condições do ensaio.

Os ensaios de atividade xilanásica foram realizados a 45°C e pH 10 para o primeiro planejamento e a 55°C e pH 9 para o segundo planejamento.

SPECTRO ZERO

- 0,9 mL substrato (sol. 1% xilana)
- incubar 5 min
- 1,5 mL de DNS
- 0,1 mL tampão
- Ebulição 5 min. Banho de gelo

PADRÃO

- 0,9 mL substrato (sol. 1% xilana)
- incubar 5 min
- 1,5 mL de DNS
- 0,1 mL solução de xilose
- Ebulição 5 min. Banho de gelo

ENSAIO ENZIMÁTICO

- 0,9 mL substrato (sol. 1% xilana)
- incubar 5 min
- 0,1 mL sol. de enzima
- incubar 5 min
- 1,5 mL de DNS
- Ebulição 5 min. Banho de gelo

BRANCO DA ENZIMA

- 0,9 mL substrato (sol. 1% xilana)
- incubar 5 min
- 1,5 mL de DNS
- 0,1 mL sol. de enzima
- Ebulição 5 min. Banho de gelo

b) Determinação da Atividade Celulásica

A atividade de celulase foi determinada incubando-se tiras de papel de filtro Watman nº 1 (50 mg) com 1 mL de solução de enzima diluída em tampão Glicina-NaOH 0,1 M, pH 10 a 50 °C por 60 minutos (IUPAC Method, 1987).

A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método de ADNS (MILLER, 1959), conforme descrito no item 3.2.5.a.

A curva padrão foi realizada nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{mol/mL}$ de glicose diluída adequadamente em tampão Glicina-NaOH 0,1 M, pH 10.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores expresso como glicose, por min a 50°C.

c) Eletroforese

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS) foi empregada para avaliar o perfil de proteínas do caldo de fermentação. O procedimento foi realizado de acordo com Laemli (1970), utilizando gel de separação com 12% e gel de concentração com 4% de acrilamida. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente, em cuba vertical, sistema Mini Protean II-BIORAD, empregando-se corrente de 200 V, 60 mA, por 45 minutos.

A coloração dos géis foi realizada em 12 horas, com solução de Coomassie G-250 contendo 12% de ácido tricloroacético e a descoloração foi obtida com água destilada.

d) Crescimento Celular

A contagem de células foi feita através de plaqueamento por diluição em série (até 10^{-9}). O microrganismo cresceu a 45°C por 24 horas em meio Ágar Nutriente. Esta contagem foi realizada em intervalos de 4 horas até o final de 28 horas de fermentação.

e) Determinação do Número de Kappa

O número Kappa representa a medida do teor de lignina residual da polpa, sendo assim, a cada etapa de branqueamento ocorre uma diminuição do número Kappa.

Para avaliação do número de Kappa foram utilizados aproximadamente 1,0 g de polpa seca (folha teste). A amostra foi desintegrada batendo-a no liquidificador com 700 mL de água destilada, até ficar livre dos grumos e dos feixes de fibras não dispersas. Após desintegrada, a polpa foi transferida para um Becker de 1000 mL contendo 50mL de solução de permanganato de potássio (KMnO_4) 0,1N e 50mL de ácido sulfúrico 4 N. Esta solução foi agitada, a temperatura foi anotada e após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 15 mL da solução de Iodeto de Potássio 1M. O iodo livre na suspensão foi titulado com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N até a solução ficar com a tonalidade

amarelo claro. Adicionou-se duas gotas da solução de amido e a titulação continuou até viragem da cor azul escura para branca.

Uma determinação em branco foi feita usando o mesmo procedimento sem a polpa. Neste caso a mistura foi titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ imediatamente.

Para calcular o número de Kappa foram utilizadas as equações 3.1, 3.2 e 3.3:

$$c = \frac{a - b}{a} \cdot 100 \quad (3.1)$$

onde:

a- volume de tiosulfato de sódio 0,1N da prova em branco (mL)

b- volume de tiosulfato de sódio 0,1N do teste com a polpa (mL)

O valor de c é utilizado para encontrar o fator de correção f na Tabela 3.2. Se a temperatura no becker não for 25°C , multiplica-se o número Kappa por um fator de correção da temperatura (ft) obtido pela equação abaixo:

$$ft = [(25 - T) \times 0,01371] + 1 \quad (3.2)$$

onde: T é a temperatura no becker ($^\circ\text{C}$)

Assim,
$$\text{Kappa} = \frac{a - b}{w} \cdot f \cdot ft \quad (3.3)$$

onde: w é a massa da polpa seca

Tabela 3.2. Fator f para correção do consumo de permanganato

F	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0,958	0,960	0,961	0,964	0,966	0,968	0,970	0,973	0,975	0,977
40	0,979	0,981	0,983	0,985	0,987	0,989	0,991	0,994	0,996	0,998
50	1,000	1,002	1,004	1,006	1,009	1,011	1,013	1,015	1,017	1,019
60	1,022	1,024	1,026	1,028	1,030	1,033	1,035	1,037	1,039	1,042
70	1,044									

Fonte: TAPPI Test Method, T 236 cm-85

f) Determinação da Viscosidade

A viscosidade da polpa indica o grau de polimerização da celulose, portanto, esse teste indica se houve degradação da celulose no processo de branqueamento. A diminuição na viscosidade da polpa pode indicar um possível decréscimo na massa molar da celulose.

Aproximadamente 0,2716g de polpa seca (folha teste) foram pesadas e colocadas em uma proveta com 25mL de água destilada. A mistura foi agitada por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 25 mL de etilenodiamina cúprica (solução 0,5 M em cobre) e a mistura foi agitada por mais 15 minutos. Essa mistura foi transferida para um viscosímetro Fenske-Oswald (Figura 3.2), previamente aferido com óleo padrão. O tempo de escoamento foi cronometrado. O cálculo de viscosidade da celulose, em centipoises, foi determinado pela equação 3.4:

$$V = K \times t \quad (3.4) \quad K = \frac{\mu}{t d_o} \cdot d_c \quad (3.5)$$

onde:

K = constante do viscosímetro determinada a partir da calibração do equipamento com óleo padrão (equação 3.5)

t = tempo de escoamento em segundos

μ = viscosidade do óleo padrão (cP);

d_o = densidade do óleo padrão a 25°C (g/mL)

d_c = densidade da solução de celulose a 25°C (g/mL)

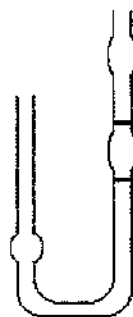


Figura 3.2 Esquema do viscosímetro

g) Alvura

A determinação da alvura da polpa foi realizada diretamente em espectrofotômetro Brightness Tester Model S4-m (Technidyne Corporation USA), com a análise direta das folhas de celulose secas.

h) Cálculo da Eficiência de Deslignificação

A eficiência de deslignificação foi determinada pela relação:

$$\% \text{ Eficiência de deslignificação} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Kappa inicial} - \text{N}^\circ \text{ Kappa final}}{\text{N}^\circ \text{ Kappa inicial}} \times 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Produção de Xilanases

B. pumilus foi utilizado na produção de xilanases alcalinas em fermentação submersa. O meio de cultivo foi estudado por planejamento experimental, objetivando maximizar a produção de xilanase em frascos agitados. Após determinar as melhores condições de cultivo, um bioreator com volume útil de 2L foi utilizado para produzir a quantidade necessária de enzima para aplicação nos testes de branqueamento.

4.1.1. Isolamento do Microrganismo

A seleção do microrganismo foi realizada em um trabalho anterior, onde foram investigadas mais de 500 colônias isoladas do solo e de madeira em decomposição. Este microrganismo foi selecionado em meio alcalino e produziu xilanase ativa a pH 10 (DUARTE *et al.*, 1999). A Figura 4.1 ilustra a atividade enzimática dos isolados a pH 10 e pH 5, a 45°C. A cepa selecionada para este trabalho foi a I, com atividade xilanásica inicial de aproximadamente 3 U/mL a pH 10. As outras cepas com maior atividade xilanásica a pH 10 (B, K e L) estão sendo estudadas em outro projeto.

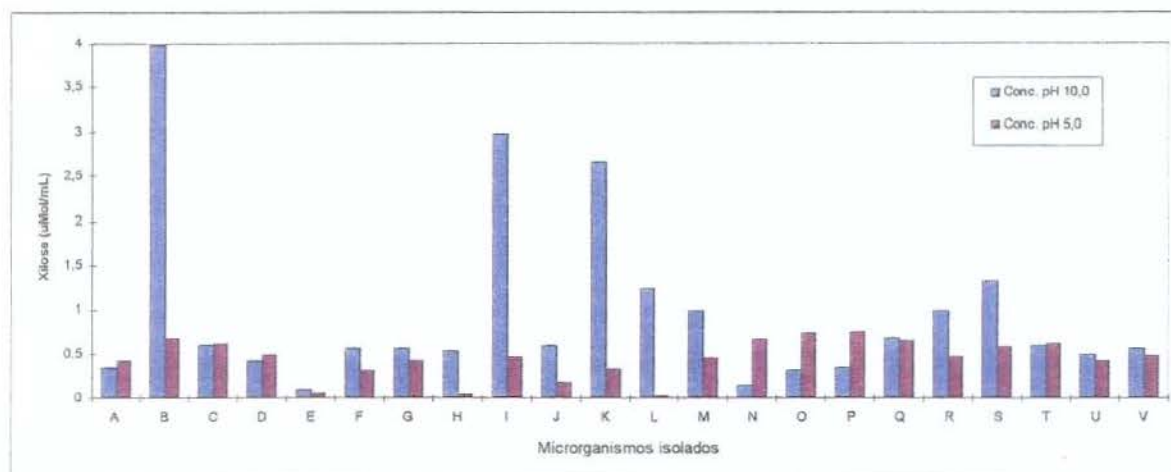


Figura 4.1: Atividade xilanásica dos isolados a 45°C, pH 5,0 e pH 10,0.

4. 1. 2. Atividade Celulásica

Xilanases alcalinas que não apresentam atividade celulásica removem a xilana da polpa de forma mais seletiva e possuem maior potencial de aplicação em branqueamento (PAICE, 1984).

A atividade celulásica (Fpase) foi investigada incubando-se o caldo de fermentação em papel de filtro (IUPAC Method, 1987). Uma unidade de atividade celulásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores expresso como glicose por minuto nas condições no ensaio. Foi encontrado 0,009 U/ml no caldo de fermentação do *B. pumilus* (DUARTE *et al.*, 1999). Segundo MILAGRES *et al.* (1993), o caldo de fermentação de xilanase por *P. janthinellum* apresentou 0,17 U/ml (Fpase) e YANG *et al.* (1995), encontrou 0.5U/ml. A atividade celulásica foi considerada não significativa quando comparada com os dados da literatura.

4. 1. 3. Otimização das Condições do Meio de Cultivo para Produção de Xilanases

A produção de xilanases por *B. pumilus* em frascos agitados foi estudada em dois planejamentos experimentais fatoriais fracionários.

4. 1. 3. 1. Primeiro Planejamento Fatorial Fracionário (2^{6-2})

Este planejamento fracionário foi utilizado para investigar as variáveis que influenciaram de forma significativa a produção de xilanases. As variáveis independentes estudadas foram: concentração de xilana, concentração de peptona, concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, concentração de KH_2PO_4 , temperatura e pH inicial do meio de cultivo. A resposta avaliada foi a atividade xilanásica a pH 10 e 45°C ao final de 24 horas de fermentação.

Os valores reais utilizados nos ensaios deste planejamento com os respectivos níveis codificados estão apresentados na tabela 4.1. O planejamento experimental fracionário de 6 fatores em 2 níveis com 4 pontos centrais e resolução IV resultou em um total de 20 ensaios, apresentado na tabela 4.2.

Tabela 4.1: Níveis das variáveis estudadas no primeiro planejamento

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
% Xilana	0,5	4,25	8,0
% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,07	0,535	1,0
% KH_2PO_4	0,1	0,25	0,4
% Peptona	0,05	0,525	1,0
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	35	40	45
pH	8,5	9,5	10,5

Tabela 4.2: Primeiro planejamento experimental fracionário 2^{6-2} .

Ensaio	Xilana	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4	Peptona	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)	Atividade Xilanásica (U/mL)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,36
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1	4,38
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1	0,09
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1	4,15
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	0,09
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	3,47
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	0,11
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	0,93
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	8,60
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1	5,06
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	5,79
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	4,52
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	8,51
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	3,84
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	7,09
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	3,96
17*	0	0	0	0	0	0	3,75
18*	0	0	0	0	0	0	3,60
19*	0	0	0	0	0	0	4,20
20*	0	0	0	0	0	0	4,05

* Ponto central

Os melhores resultados da produção de xilanases para este planejamento foram os obtidos através da composição apresentada nos ensaios 9 (8,60 U/mL) e 13 (8,51 U/mL). É

possível observar que ambos os ensaios foram compostos por baixas concentrações de xilana (0,5 %) e sulfato amônio (0,07%) e de alta concentração de peptona (1%), fonte de nitrogênio orgânica. Também foi verificado que para este planejamento a relação C/N (carbono/nitrogênio) de 0,5 foi a mais indicada, visto que o ensaio 15 (que apresentou o terceiro melhor resultado de produção, 7,09 U/mL) também foi composto por 0,5 % de xilana e 1% de peptona.

a) Análise dos Efeitos de cada Variável sobre a Produção de Xilanases

Os efeitos principais das variáveis (ao passar do nível -1 para o nível +1) em 24 horas de fermentação podem ser observados na figura 4.2 e na tabela 4.3, onde também é possível verificar quais variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre a atividade enzimática.

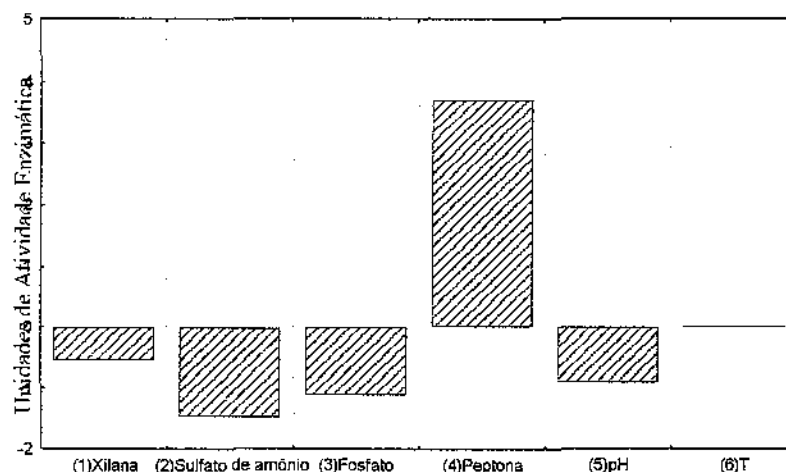


Figura 4.2: Efeitos das variáveis sobre a produção de xilanases no primeiro planejamento

Tabela 4.3: Efeitos principais do primeiro planejamento em 24 horas de fermentação

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro padrão
Média	4,03*	0,061*
% Xilana	-0,54	0,137
% (NH ₄) ₂ SO ₄	-1,46*	0,137*
% KH ₂ PO ₄	-1,12*	0,137*
% Peptona	3,72*	0,137*
pH	-0,91*	0,137*
T	0,009	0,137

* valores estatisticamente significativos

Analisando a fonte de nitrogênio, foi observada a preferência pela fonte orgânica, visto que a peptona ao passar de 0,05% (nível -1) para 1% (nível+1) produziu um efeito significativo estatisticamente positivo sobre a produção de xilanase, ou seja, ocorreu um aumento de aproximadamente 4 unidades na atividade enzimática. Para o sulfato de amônio (fonte inorgânica), a mudança de 0,07% para 1% representou um efeito negativo na produção. Portanto, a atividade enzimática diminuiu (aproximadamente 1,5 unidades) quando a concentração de sulfato de amônio foi aumentada.

Outros fatores como a concentração de xilana, concentração de fosfato e pH inicial do meio também apresentaram um efeito negativo na atividade enzimática ao passar do nível (-1) para o nível (+1).

Visto que a xilana foi a única fonte de carbono usada na fermentação, era esperado que esta exercesse maior influência sobre a atividade enzimática. O efeito não significativo desta variável sobre a produção de xilanase ocorreu provavelmente porque foi utilizada uma faixa de concentração de xilana muito ampla.

Através da análise dos efeitos foi possível eliminar a variável temperatura no segundo planejamento, visto que esta praticamente não produziu nenhum efeito na produção. A temperatura foi mantida constante em 40 °C, valor do ponto central no primeiro planejamento. Como o fosfato de potássio apresentou efeito negativo na produção, sua concentração foi fixada em 0,1% (nível -1).

Para o segundo planejamento, foram mantidos os mesmos níveis para o pH inicial do meio de cultivo e a amplitude das concentrações de xilana e de sulfato de amônio foram diminuídas.

Como a peptona é considerada um item caro para produção de enzimas em larga escala, optou-se por manter a mesma faixa de estudo, apesar desta ter apresentado um efeito positivo na atividade enzimática no primeiro planejamento.

4. 1. 3. 2. Segundo Planejamento Fatorial Fracionário (2^{4-1})

Como algumas variáveis foram fixadas (temperatura em 40°C e fosfato de potássio em 0,1%) e foram estabelecidas novas faixas de estudo para outras, optou-se por realizar

mais um planejamento experimental fracionário para estudar possíveis mudanças nos efeitos das variáveis sobre a produção de xilanase.

As variáveis independentes estudadas foram: concentração de xilana, concentração de peptona, concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH inicial do meio de cultivo. A resposta avaliada foi a atividade xilanásica ao longo da fermentação a pH 9 e 55°C.

Os valores reais utilizados nos ensaios deste planejamento com os respectivos níveis codificados estão apresentados na tabela 4.4. O planejamento experimental fracionário de 4 fatores em 2 níveis com 4 pontos centrais e resolução IV resultou em um total de 12 ensaios, apresentado na tabela 4.5.

Tabela 4.4: Níveis das variáveis estudadas no segundo planejamento

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
% Xilana	1,0	3,0	5,0
% Peptona	0,1	0,6	1,1
% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,05	0,15	0,25
pH	8,5	9,5	10,5

Tabela 4.5: Segundo Planejamento experimental fracionário 2^{4+1}

Ensaio	Xilana	Peptona	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	pH	Ativ. U/mL 12 h	Ativ. U/mL 16 h	Ativ. U/mL 20 h	Ativ. U/mL 24 h	Ativ. U/mL 28 h
1	-1	-1	-1	-1	36,23	45,89	41,37	25,43	22,08
2	+1	-1	-1	+1	39,07	41,41	38,59	42,34	36,37
3	-1	+1	-1	+1	94,29	77,84	40,63	14,67	15,94
4	+1	+1	-1	-1	70,28	74,94	76,62	124,92	81,25
5	-1	-1	+1	+1	18,25	52,01	70,08	65,57	38,65
6	+1	-1	+1	-1	28,53	34,61	40,92	51,30	52,80
7	-1	+1	+1	-1	121,29	96,39	93,17	56,40	54,19
8	+1	+1	+1	+1	18,42	43,76	81,62	71,19	73,64
9 *	0	0	0	0	61,67	73,09	128,71	116,05	108,66
10 *	0	0	0	0	56,44	72,69	129,38	117,42	110,94
11 *	0	0	0	0	59,30	69,22	125,97	119,01	102,03
12 *	0	0	0	0	60,99	77,41	127,71	115,91	109,31

* Ponto central

a) Atividade Enzimática em Função do Tempo de Fermentação

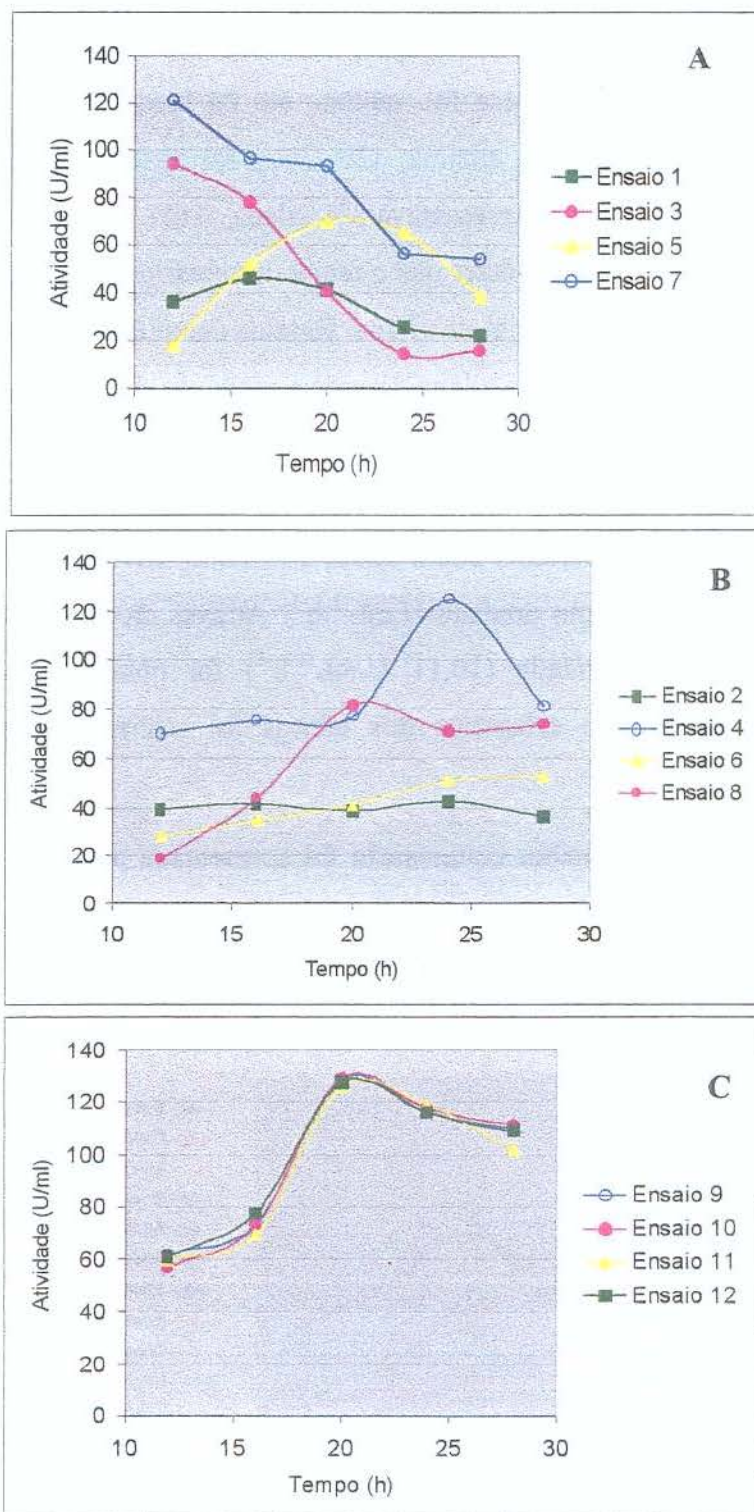


Figura 4.3: Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental. (A) ensaios com mínimo de xilana; (B) ensaios com máximo de xilana; (C) ponto central

A Figura 4.3 apresenta os resultados do estudo da produção de xilanase. Pode-se observar no ensaio 7 da Figura 4.3-A (ensaios com mínimo de xilana) que a produção xilanásica foi máxima em 12 horas de fermentação, 121U/mL. No ensaio 4 da Figura 4.3-B foi observado que a produção xilanásica foi máxima em 24 horas de fermentação, 125 U/mL. Contudo, a maior produção da enzima, 129 U/ml, foi observada em 20 horas de fermentação no ponto central, o qual apresentava 3% xilana, 0,6% peptona, 0,15% sulfato de amônio e pH 9,5. Portanto, pode-se dizer que o tempo necessário para máxima produção foi influenciado pela concentração inicial de xilana. Ensaios complementares (4.1.4) foram realizados para investigar o consumo de xilana durante a produção de xilanases.

b) Produtividade

A produtividade pode ser definida como sendo a razão da atividade enzimática pelo tempo de fermentação, tendo como unidade $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Através da Figura 4.4 é possível verificar que a maior produtividade ($10,11 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) foi obtida em 12 horas de fermentação. Portanto a análise estatística dos efeitos foi realizada neste tempo de fermentação.

Para este planejamento a melhor composição foi apresentada pelo ensaio 7, pois foi obtida elevada produção de xilanase com concentração mínima de xilana e menor tempo de fermentação, resultado econômico mais satisfatório.

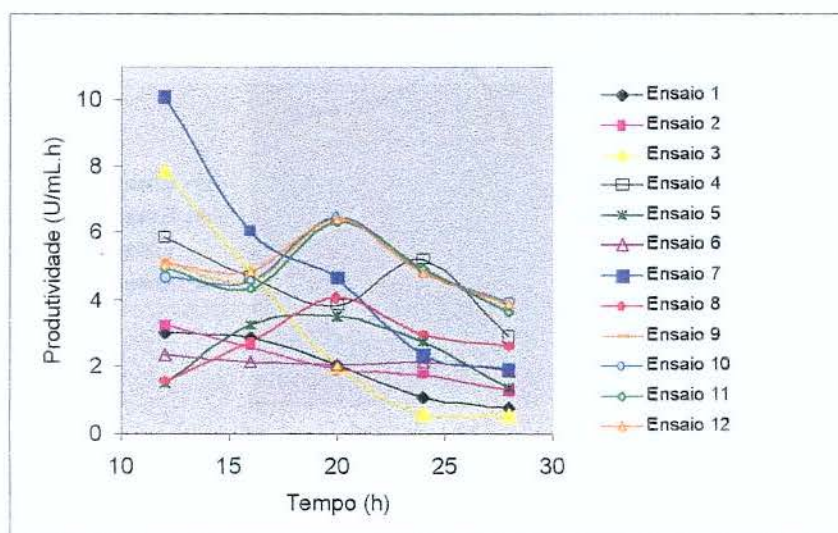


Figura 4.4: Produtividade ao longo da fermentação para o segundo planejamento

c) Curva de Atividade Xilanásica do Ensaio 7 do Segundo Planejamento

No segundo planejamento a atividade xilanásica foi monitorada a partir de 12 horas de fermentação para todos os ensaios. Como para o ensaio 7 a produção xilanásica máxima foi obtida em 12 horas (primeira retirada de amostra neste planejamento), optou-se por realizar outra fermentação para verificar o comportamento da atividade enzimática desde o início, garantindo assim não perder o tempo de máxima produção para a composição apresentada neste ensaio. A figura 4.5 apresenta a curva de atividade xilanásica obtida com a composição do ensaio 7 desde o início de fermentação.

Pode-se observar nesta figura que a produção xilanásica foi máxima em 10 horas de fermentação, confirmando assim que a composição apresentada pelo ensaio 7 era a que obteve melhor produtividade ($12,17 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

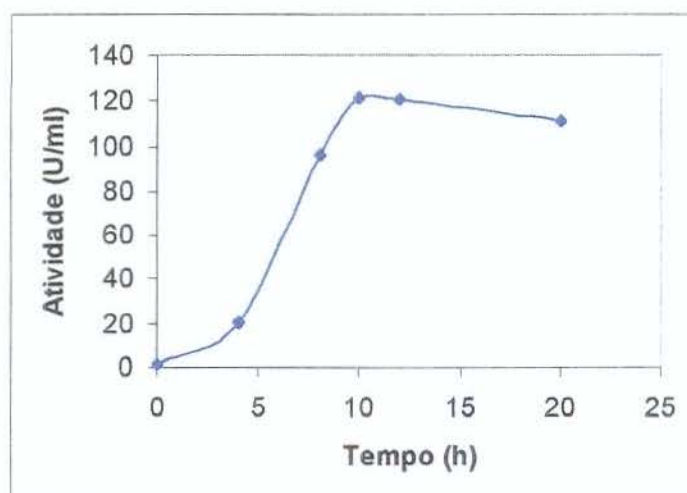


Figura 4.5: Curva de atividade xilanásica para o ensaio 7 do segundo planejamento

d) Análise dos Efeitos de cada Variável sobre a Produção de Xilanase

Os efeitos principais das variáveis ao longo do tempo (ao passar do nível -1 para o nível +1) podem ser observados na Figura 4.6 e na Tabela 4.6, onde também é possível verificar quais variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre a atividade enzimática.

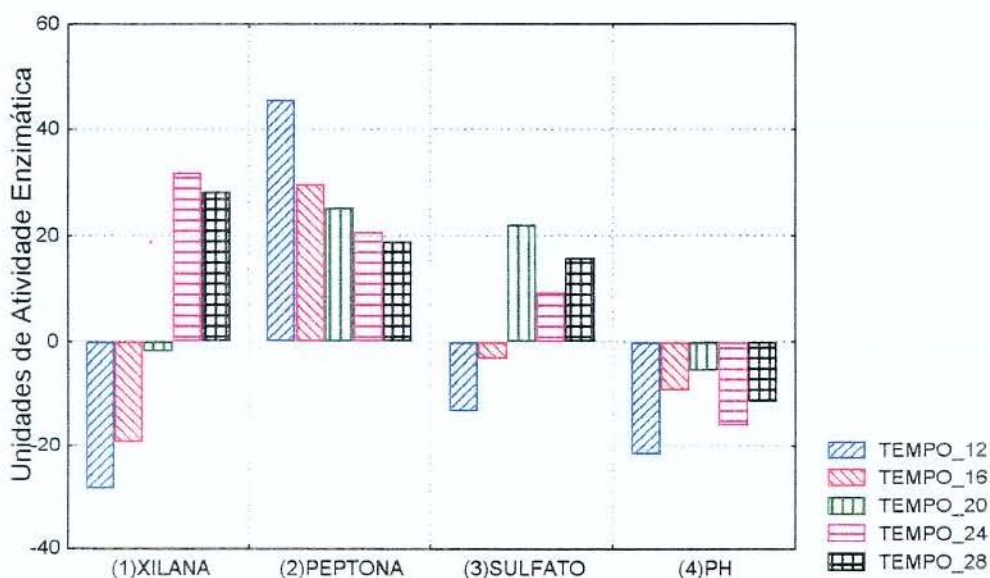


Figura 4.6: Efeitos das variáveis sobre a produção de xilanases no segundo planejamento

A concentração de xilana apresentou um efeito negativo na atividade enzimática até as 16 horas de fermentação e produziu um efeito positivo após 24 horas. Em 12 horas de fermentação, verificou-se uma redução de aproximadamente 28 unidades na atividade enzimática quando a concentração de xilana foi aumentada de 1% para 5%; já em 24 horas, esse aumento na concentração representou um incremento de 31 unidades na atividade xilanásica. Entretanto, a concentração de xilana não apresentou efeito significativo estatisticamente em 20 horas de fermentação.

Foi observado que a peptona ao passar de 0,1% (nível -1) para 1,1% (nível+1) produziu um efeito significativo estatisticamente positivo sobre a atividade enzimática no decorrer de toda a fermentação. A maior influência da peptona sobre produção xilanásica ocorreu em 12 horas de fermentação, onde foi verificado um incremento de aproximadamente 45 unidades na atividade enzimática quando a concentração de peptona foi aumentada de 0,1% para 1,1%. Este efeito positivo foi menos significativo com o decorrer da fermentação.

Para o sulfato de amônio (fonte inorgânica), a mudança de 0,05% para 0,25% representou um efeito negativo na produção até as 16 horas de fermentação. Após as 20 horas este efeito foi invertido, ocorrendo um incremento na atividade enzimática com o aumento da concentração de sulfato de amônio. Em 12 horas de fermentação esse aumento

aumento da concentração de sulfato de amônio. Em 12 horas de fermentação esse aumento na concentração de sulfato representou um decréscimo de 13 unidades na atividade enzimática e em 20 horas resultou em um incremento de 22 unidades.

O efeito verificado nestas três variáveis ocorreu provavelmente porque o microrganismo consumia preferencialmente a peptona (fonte de nitrogênio orgânica de mais fácil assimilação) no início da fermentação e após 20 horas passou a consumir também outras fontes de assimilação mais complexa.

O pH inicial do meio produziu um efeito negativo na atividade enzimática ao passar do nível (-1) para o nível (+1) durante toda a fermentação.

Tabela 4.6: Efeitos principais do segundo planejamento em 12 horas de fermentação

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro padrão
Média	55,40*	0,673*
% Xilana	-28,44*	1,648*
% Peptona	45,55*	1,648*
% (NH ₄) ₂ SO ₄	-13,34*	1,648*
pH	-21,57*	1,648*

* valores estatisticamente significativos

Todas as variáveis deste planejamento apresentaram efeito estatisticamente significativo em 12 horas de fermentação.

4. 1. 4. Ensaio Complementares

Ensaio complementares foram realizados com o objetivo de aprofundar o estudo da produção de xilanases alcalinas por *B. pumilus*. A figura 4.7 apresenta a curva de consumo de xilana, a curva de crescimento celular e a curva de atividade enzimática para a produção de xilanase por *B. pumilus* utilizando a composição do meio de cultivo (Tabela 4.7) apresentada no ponto central do segundo planejamento.

Tabela 4.7: Composição do meio de cultivo do ponto central do segundo planejamento

% Xilana	% Peptona	% (NH ₄) ₂ SO ₄	pH
3,0	0,6	0,15	9,5

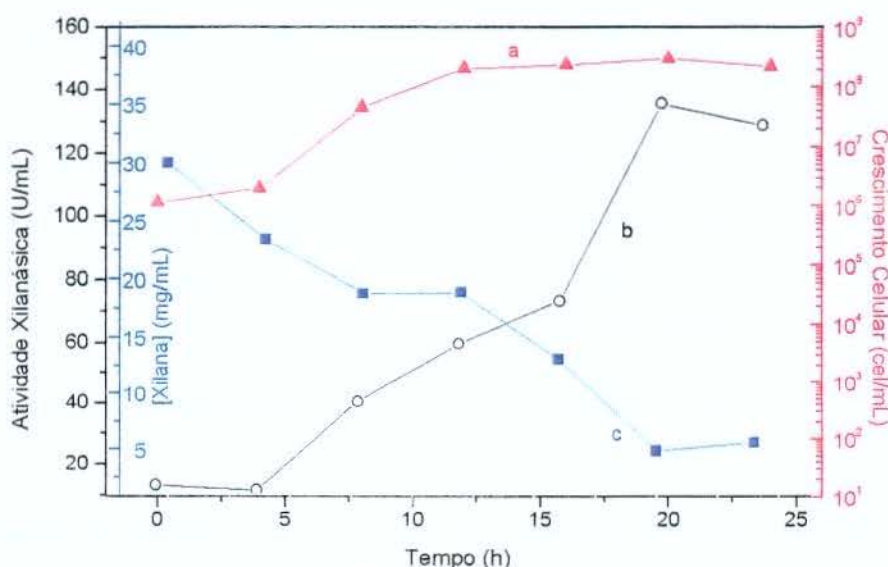


Figura 4.7: Monitoramento da produção de xilanases: a) crescimento celular; b) atividade xilanásica; c) consumo de xilana

Como pode ser observado na Figura 4.7, a curva de atividade xilanásica apresentou um comportamento oposto a curva de consumo de xilana, sendo que a atividade máxima foi obtida quando praticamente toda a xilana já havia sido consumida durante a fermentação. Portanto, pode-se dizer que o tempo para máxima produção foi influenciado pela concentração de xilana.

Este efeito também pode ser verificado comparando os gráficos da Figura 4.3, onde níveis similares de produção (entre 120 e 130 U/mL) foram obtidos com concentração inicial mínima de xilana em 12 horas (ensaio 7) e com concentração inicial máxima de xilana em 24 horas de fermentação (ensaio 4).

De acordo com SAMAIN *et al.* (1997), a síntese de xilanases é induzida por produtos solúveis da hidrólise da xilana (xilooligossacarídeos) e igualmente, sofre repressão catabólica quando estes oligossacarídeos se acumulam no meio.

Este efeito de repressão catabólica por produtos da hidrólise da xilana também foi verificado na produção de xilanases por *B. pumillus* (Figura 4.8). Isto explica a dependência da concentração inicial de xilana no tempo ótimo de fermentação.

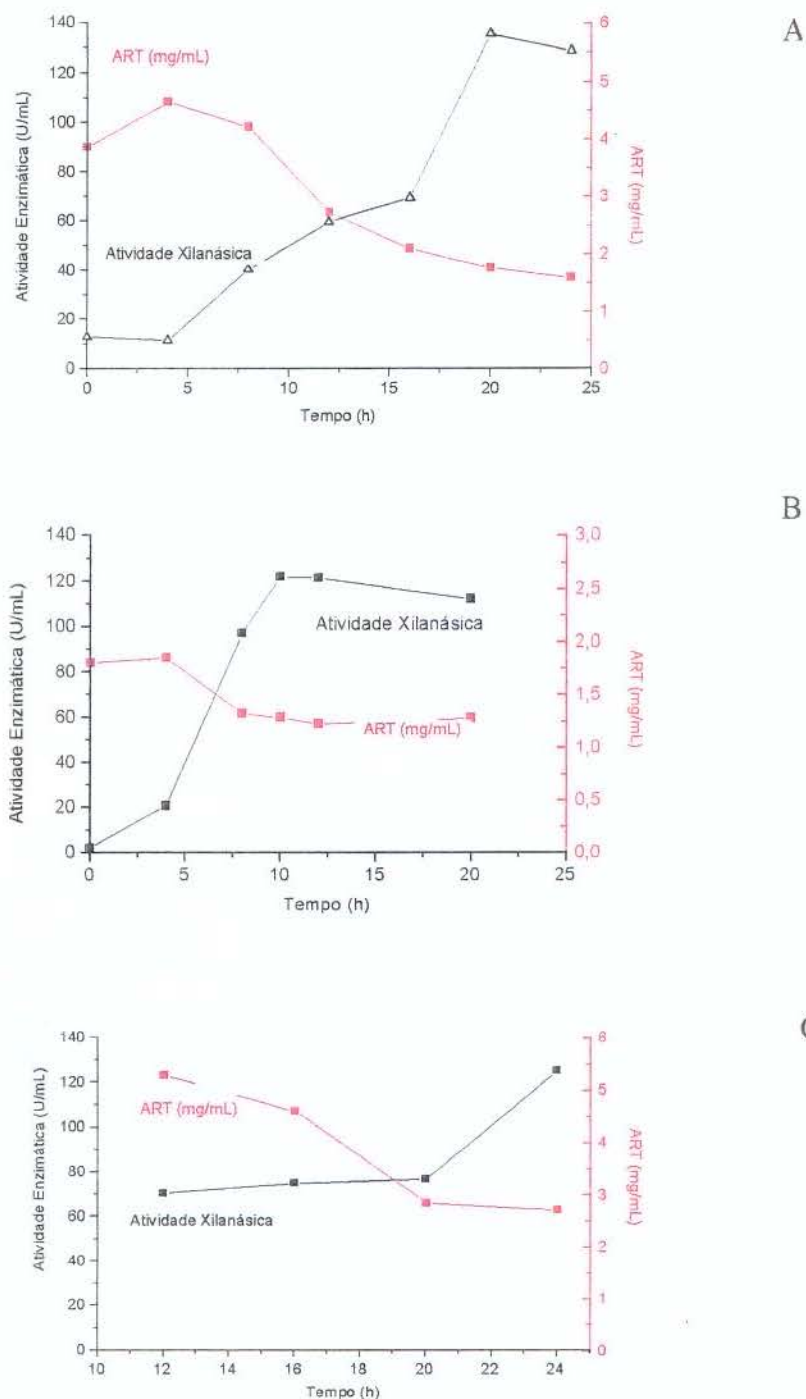


Figura 4.8: Açúcares redutores presentes e atividade enzimática ao longo da fermentação do segundo planejamento experimental. (A) ponto central (com 3% de xilana); (B) ensaio 7 (com 1% de xilana); (C) ensaio 4 (com 5% de xilana)

Em um estudo prévio, SAMAIN *et al.* (1992) observou duas fases bem distintas durante a fermentação em batelada por *Bacillus sp.* XE em xilana. Na primeira fase, a hidrólise da fração mais acessível de xilana permite um crescimento não limitado pela fonte

de carbono. Durante esta fase a acumulação de xilooligossacarídeos no meio provoca a repressão catabólica da síntese da xilanase. Com o crescimento celular, a hidrólise da xilana decresce e consequentemente a taxa de consumo de xilooligossacarídeos aumenta; a concentração destes começa então a limitar o crescimento e a favorecer a produção de xilanases. Esta segunda fase de produção de xilanases com crescimento restrito permanece até que xilooligossacarídeos suficientes sejam liberados da fração menos acessível de xilana.

A Figura 4.9 ilustra um gel de eletroforese SDS-PAGE de amostras obtidas nos pontos centrais dos caldos de fermentação de xilanase do segundo planejamento (ensaios 9, 10 e 11) e a Tabela 4.8 apresenta a massa molar das 5 principais bandas das faixas 2, 3 e 4.

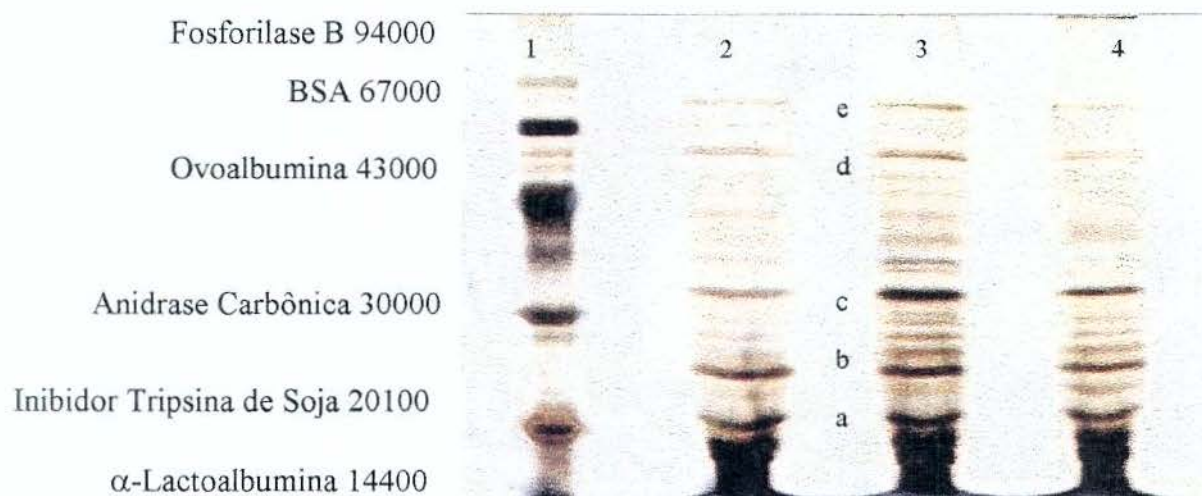


Figura 4.9: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS dos caldos de fermentação do segundo planejamento: 1) Marcador padrão de massa molar (Da); 2) Ensaio 9; 3) Ensaio 10; 4) Ensaio 11.

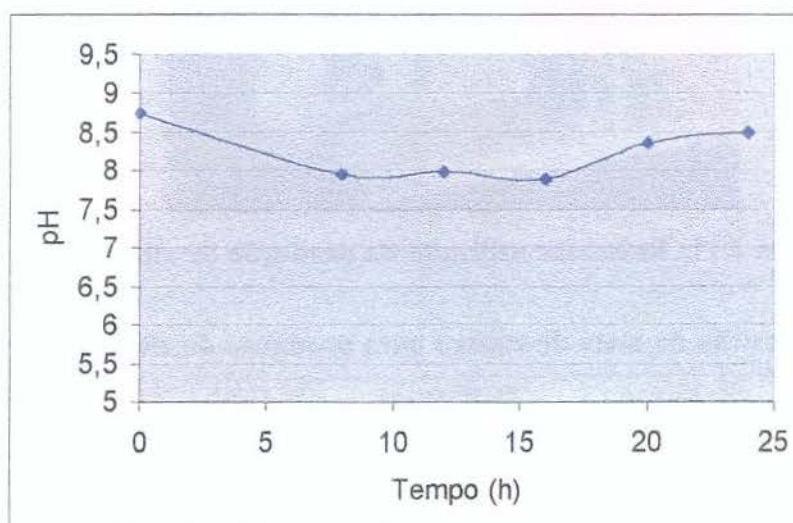
De acordo com SAMAIN *et al.* (1997), a massa molar da xilanase deve ser baixa para facilitar sua difusão nas fibras da polpa, viabilizando assim, a sua aplicação em branqueamento de polpas de papel.

A massa molar da xilanase produzida por *B. pumilus* (PANBANGRED *et al.*, 1983), foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS em 24 kDa. *Bacillus* sp. produziu xilanase alcalina com massa molar de 32 kDa (BLANCO *et al.*, 1995).

Tabela 4.8: Massa Molar das principais bandas das faixas 2, 3 e 4.

a	B	C	d	E
20284 Da	24235 Da	33387 Da	57967 Da	70501 Da

A Figura 4.9 apresenta o comportamento do pH no ponto central durante a produção de xilanase do segundo planejamento. O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 9,5 e a primeira leitura do pH após a adição do inóculo foi 8,75.

**Figura 4.10: Monitoramento do pH no ponto central do segundo planejamento**

4. 1. 5. Produção da Xilanase em Biorreator

A Figura 4.11 mostra o fermentador Bioflow III utilizado para a produção de xilanases e a Tabela 4.9 apresenta a composição do meio de cultivo utilizada nesta fermentação.

As condições de operação foram:

- Volume útil = 1,5 L em dorna de 2L.
- Fração de inóculo = 20%, para 1,5 litros foram adicionados 300mL de inóculo.
- D.O. = mantida em 50% por controle simultâneo da agitação e da entrada de ar comprimido
- T = mantida em 40°C
- pH (após a adição do inóculo) = 8,75 (não foi controlado, somente monitorado)



Figura 4.11: Bioreator utilizado na produção de xilanases

Tabela 4.9: Composição do meio de cultivo para produção de xilanases no bioreator

% Xilana	% Peptona	% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
3,0	0,6	0,15

Para esta produção de xilanases em bioreator, a atividade máxima foi de 173,30 U/mL em 10 horas de fermentação, alcançando uma produtividade maior do que a obtida em frascos agitados, $17,33 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Este resultado obtido na primeira fermentação em bioreator pode indicar que níveis mais elevados de atividade enzimática podem ser alcançados se um estudo de otimização das condições de operação em bioreator fosse realizado.

Este caldo enzimático foi utilizado para a aplicação em branqueamento de polpas de papel.

4. 1. 6. Comparação da Produtividade de Xilanases com Dados da Literatura

A Tabela 4.10 apresenta os resultados da produção de xilanases por *B. pumilus* neste trabalho comparada com as maiores produtividades obtidas por outras cepas descritas na literatura.

Tabela 4.10: Comparação da produtividade obtida com dados da literatura

Microrganismo	Atividade Xilanásica (U/mL)	Condições do Teste (pH e T°C)	Tempo de Cultivo (h)	Produtividade (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	Referência
<i>Bacillus</i> sp. Mutante	1000	6,0 e 60	15	66,67	SAMAIN <i>et al.</i> , 1997
<i>B. pumilus</i>	173	9,0 e 55	10	17,30	Este trabalho
<i>S. lividans</i> recombinante	784	nd*	48	16,33	BERTRAND <i>et al.</i> , 1989
<i>Bacillus</i> sp.	100	6,0 e 60	9	11,11	SAMAIN <i>et al.</i> , 1992
<i>A. pullulans</i> mutante	633	nd*	70	9,04	LEATHERS, 1986
<i>Bacillus circulans</i>	400	nd*	48	8,33	RÄTTÖ <i>et al.</i> , 1992
Yeast sp.	570	nd*	70	8,14	BASTAWDE <i>et al.</i> , 1994
<i>Trichoderma reesei</i>	350	nd*	80	4,37	GAMERITH & STRUTZENBERG, 1992
<i>Fusarium oxysporum</i>	245	7,0 e 50	96	2,55	CHRISTAKOPOULOS <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus</i> sp.	28	8,5 e 50	48	0,58	YANG <i>et al.</i> , 1995

* não determinado

A produtividade obtida (17,33 U.mL⁻¹.h⁻¹) pelo *B. pumilus* evidencia seu potencial para produção de xilanases alcalinas visando aplicação em branqueamento de polpas de papel. A produtividade alcançada neste trabalho foi superada somente pela obtida por SAMAIN *et al.* 1997 (66,67 U.mL⁻¹.h⁻¹); que utilizou um microrganismo modificado geneticamente e xilana hidrolisada como substrato, obtendo assim, um aumento de 6 vezes na produtividade quando comparado com o trabalho anterior.

4.2. Aplicação de Xilanases em Branqueamento de Polpa Kraft

Os testes de aplicação da xilanase na polpa Kraft foram realizados de acordo com o item 3.2.4 e os parâmetros de avaliação foram a absorbância a 280nm, o número Kappa, a alvura e a viscosidade. A leitura da absorbância a 280 nm indicou o teor de lignina residual, pois quanto maior a absorbância, maior quantidade de lignina foi liberada em solução, evidenciando uma maior atuação da xilanase na polpa.

A Tabela 4.11 apresenta os resultados de aplicação da xilanase de *B. pumilus* na polpa Kraft e a Tabela 4.12 apresenta os resultados de aplicação da enzima comercial Pulpzyme HC da Novo Nordisk.

Tabela 4.11: Aplicação de xilanases de *B. pumilus* na polpa Kraft

Teste	Concentração (U/10g polpa)	Tempo (horas)	Número Kappa	Alvura (°GE)	Viscosidade (cP)	Eficiência Deslignificação (%)	Abs 280nm
P	-----	-----	10,5	49,2	41,0	-----	-----
C	-----	2	10,3	48,8	42,0	-----	0,408
E	50	2	9,0	50,9	42,8	14	0,566
E	200	2	8,8	52,0	42,4	16	0,792
E	500	2	7,8	52,6	42,0	26	0,846

P = Polpa antes do tratamento enzimático

C = Controle sem a aplicação da enzima

E = Xilanases de *B. pumilus*

Tabela 4.12: Aplicação da xilanase Comercial na polpa Kraft

Teste	Concentração (U/10g polpa)	Tempo (horas)	Número Kappa	Alvura (°GE)	Viscosidade (cP)	Eficiência Deslignificação (%)	Abs 280nm
P	-----	-----	10,5	49,2	41,0	-----	-----
C	-----	3	10,3	48,8	42,0	-----	0,408
EC	50	3	8,6	52,1	42,0	18	0,711
EC	250	3	7,9	54,3	43,0	25	0,857

EC = Xilanase comercial

Não foi possível verificar a redução de cloro no processo utilizando a xilanase como uma etapa de pré-branqueamento. O ideal seria termos utilizado uma sequência de branqueamento usada industrialmente (como a da Champion (C_DE_{OP}D), por exemplo) após aplicação da enzima, para atingir viscosidade, número Kappa e alvura finais de 18-24cP, Kappa 1 e 89°GE respectivamente. A utilização da sequência industrial no tratamento da polpa não foi possível devido a falta de equipamentos e condições de segurança, pois o Cl₂ (cloro) e o ClO₂ (dióxido de cloro) são altamente tóxicos, além de que o dióxido de cloro deve ser produzido no local de consumo porque é explosivo e não deve ser transportado.

Provavelmente o método mais rápido de medir o teor de lignina residual na solução é a medida da absorbância a 280nm (da água residual) após o estágio enzimático. Quanto maior a absorbância maior a quantidade de lignina residual e consequentemente mais efetivo foi o tratamento. Pela Tabela 4.11 podemos verificar que a absorbância a 280nm aumenta consideravelmente (de 0,408 para 0,846) na polpa tratada com 50U/g de enzima em relação ao controle.

Também foi possível observar uma redução de 2,5 unidades no número Kappa, de 10,3, polpa não tratada (C) para 7,8 na polpa tratada com 50U/g polpa seca (Tabela 4.11), neste caso a eficiência de deslignificação foi de 26%.

A Figura 4.12 apresenta uma comparação entre o tratamento feito com a enzima comercial Pulpzyme com o tratamento utilizando xilanases de *B. pumilus* produzida no laboratório. Pode-se observar que a enzima comercial reduz o número Kappa em aproximadamente 0,5 unidades a mais que a xilanase de *B. pumilus*. Entretanto, os valores de pH testados foram diferentes, para a enzima comercial foi utilizado pH 8,0 e para a enzima de *B. pumilus* pH 9,0, indicando elevada resistência à alcalinidade da segunda enzima.

BOCCHINI et al. (1997), após o branqueamento enzimático da polpa, continuaram a sequência com dióxido de cloro e extração alcalina, obtendo uma redução de 23% na taxa de cloro utilizada na deslignificação da polpa para atingir os mesmos níveis de número Kappa e alvura do que os obtidos sem o tratamento com a enzima. Nesta sequência foi

observada a redução de apenas uma unidade no número Kappa com o tratamento enzimático.

MUNK (1993) utilizou um branqueamento ECF (branqueamento sem adição de cloro elementar) com tratamento prévio com xilanases na sequência de branqueamento XDEDED (xilanase - dióxido de cloro - extração alcalina). O estágio enzimático alcançou uma redução de 1,4 unidades no número Kappa e no final do branqueamento foi obtido uma alvura de 91% com economia de 25% de cloro ativo e 16% de NaOH comparando-se com a sequência sem o tratamento enzimático.

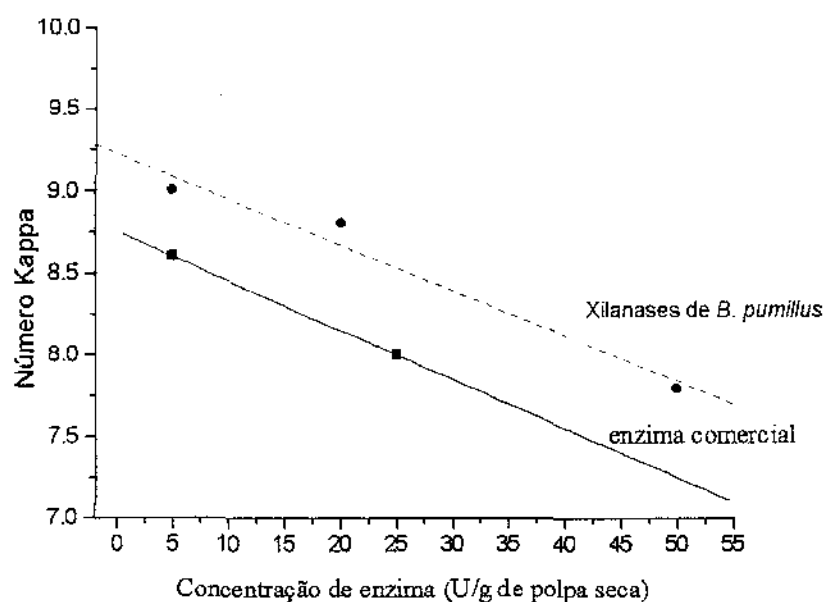


Figura 4.12: Comparação entre os tratamentos com xilanases de *B. pumilus* e a xilanase comercial

De acordo com a literatura, o uso da xilanases no branqueamento da polpa Kraft tem mostrado, em geral, uma redução no uso de cloro utilizado no branqueamento químico convencional atingindo alta brancura sem alterar as propriedades da polpa. Resultados de laboratório e de plantas industriais mostraram uma redução de aproximadamente 20-25% de cloro ativo total para madeiras duras e uma redução de 10-15% para madeiras moles (VIKARI et al., 1987; BUCHERT et al., 1992; SHERKER et al., 1992; YANG et al. 1993). Essa redução no uso de reagentes químicos pode representar uma diminuição no

custo quando se utiliza grandes quantidades de cloro e também uma redução da quantidade de organoclorados nos efluentes, o que resulta em benefícios para área ambiental (BAJPAI, 1999).

5. CONCLUSÕES

Níveis similares de produção (entre 120 e 130 U/mL) foram obtidos no segundo planejamento experimental com concentração inicial mínima de xilana em 12 horas (ensaio 7) e com concentração inicial máxima de xilana em 24 horas de fermentação (ensaio 4). Essa dependência da concentração inicial de xilana no tempo ótimo de fermentação foi verificada devido à repressão catabólica por produtos da hidrólise da xilana.

A maior produtividade xilanásica em frascos agitados ($12,17 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi verificada no ensaio 7 do segundo planejamento experimental, pois foi obtida elevada produção de xilanase (121U/mL) com concentração mínima de xilana (1%) e menor tempo de fermentação (10 horas), resultado econômico satisfatório.

A maior produção da enzima em frascos agitados (129 U/mL) foi verificada no ponto central do segundo planejamento experimental em 20 horas de fermentação com uma produtividade de $6,47 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$, o qual apresentava 3% xilana, 0,6% peptona, 0,15% sulfato de amônio e pH 9,5.

Para a produção de xilanases no bioreator com a mesma composição, a atividade máxima foi de 173,30 U/mL (a pH 9 e 55 °C) em 10 horas de fermentação, alcançando uma produtividade maior do que a obtida em frascos agitados, $17,33 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Essa produtividade elevada evidencia o potencial do *B. pumilus* para produção de xilanases alcalinas e termofílicas visando aplicação em branqueamento de polpas de papel.

Quanto a aplicação da enzima produzida no branqueamento de polpas kraft, foi verificado uma redução de 2,5 unidades no número Kappa sem afetar a viscosidade da polpa, o que representa uma eficiência de deslignificação de 26%.

A adição de xilanases de *B. pumilus* produzidas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (FEQ-UNICAMP) no pré-branqueamento enzimático de polpas de papel apresentou resultados superiores aos encontrados na literatura, evidenciando o potencial desta enzima para aplicação em indústrias de papel e celulose.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar um planejamento experimental completo, incluindo a configuração estrela (pontos axiais), para obter as superfícies de resposta para o meio de cultivo otimizado e gerar um modelo que possa ser utilizado para fins preditivos.
- Otimizar as condições de operação da produção de xilanases em bioreator, incluindo a aeração e a agitação, ainda não estudadas com este microrganismo.
- Produzir xilanases em bioreator utilizando xilana como substrato em batelada alimentada.
- Estudar a concentração ótima de inóculo, visando diminuir a fase lag e consequentemente, aumentar a produtividade.
- Estudar a viabilidade econômica para a produção de xilanases em larga escala.
- Estudar a cinética da produção de xilanases por *B. pumilus* no bioreator, incluindo os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$, bem como os rendimentos $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$.
- Aprofundar o estudo da aplicação de xilanases no pré-branqueamento de polpas Kraft, continuar a seqüência de branqueamento após a aplicação da enzima e verificar a porcentagem de redução de cloro no processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. H., MORAES, F., ZANIN, G. M. Application of Commercial Xylanase on Totally Chlorine Free (TCF) Bleaching Sequences of Softwood Kraft Pulp. In: FIFTH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS. **Proceedings** Curitiba, 1997. p. 141.
- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p. 353-368, 1992.
- BASTAWDE, K. B., PUNTANBEKAR, U. S., GOKHALE, D. V. Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. **Journal Ind. Microbiol.** v.13, p. 220-224, 1994.
- BAILEY, M. J., BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, n.3, p.257-270, 1992.
- BAJPAI, P. Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. **Biotechnology Progress**, v.15, n.2, p.147-157, 1999.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Ed. UNICAMP – Campinas, 1995.
- BECK, C. I., SCOTT, D. Enzymes in foods - for better or worse. **Adv. Chem. Ser.** v.136, n.1, 1974.
- BERTRAND, J. L., MOROSOLI, R. SHARECK, F., KLUEPFEL, D. Expression of the xylanase *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrats. **Biotechnol. Bioeng.** v.33, p. 791-794, 1989.
- BEZALEL, L., SHOHAM, Y., ROSENBERG, E. Characterization and delignification activity of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.57-62, 1993.

- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.286-290, 1985.
- BIELY, P. Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases. **ACS Symp. Ser.**, v.460, p.408, 1991.
- BIM, M. A., TAGLIARI, C. V., DUARTE, M. C. T., PORTUGAL, E. P., PONEZI, A. N. e FRANCO, T. T. Optimization and Extraction of Alkaline Xylanases Produced of *Bacillus pumilus*. IN: FIFTH EUROPEAN WORKSHOP ON LIGNOCELULOSICS AND PULP. **Proceedings**, Aveiro, Portugal. p.27-31, 1998.
- BLANCO, A., VIDAL, T., COLOM, J. F., PASTOR, F. I. J. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus sp.* strain BP-23. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4468-4470, 1995.
- BOCCHINI, D. A., TAVARES, V. B., SILVA, R. Produção e Aplicação de Xilanase de *Bacillus sp.-1* no Branqueamento de Pasta Kraft de Eucalipto. In: 30º CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL da ABTCP, São Paulo –SP, novembro, 1997.
- BOURBONNAIS, R., JURASEK, L., PAICE, M. G. Biotechnology in the pulp and paper industry. IN: NATIONAL BIOTECHNOLOGY ADVISORY COMMITTEE, Ottawa, Canada, 1991.
- BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. **Statistics for Experiments**. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. Nova York, Wiley, 1978.
- BUCHERT, J., RANUA, M.; KANTELINEN, A., VIKARI, L. The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of pini Kraft pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.37, p. 825-829, 1992.
- BUCHERT, J., SALMINEN, J., SIIKA-AHO, M., RANUA, M., VIKARI, L. The role of *Trichoderma reesei* xylanase and mannanase in the treatment of soofwood Kraft pulp prior to bleaching. **Holzforschung**, v.47, p. 473, 1993.

- CHAUVET, J.M., COMTAT, J., NOE, P. Assistance in bleaching of never-dried pulps by use of xylanases, consequences on pulp properties. **International Symposium Wood and Pulping Chemistry**. Paris, v.2, p. 325-327, 1987.
- CHRISTAKOPOULOS, P., MAMMA, D., NERINCKX, W., KEKOS, D., MACRIS, B., CLAEYSSSENS, M. Production and partial characterization of xylanase from *Fusarium oxysporum*. **Bioresource Technology**. v.58, p.115-119, 1996.
- CHRISTOV, L. P. & PRIOR, B. A. Xylan removal from dissolving pulp using enzymes of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnol. Lett.** v.15, n.12, p.1269-1274, 1993.
- COUGHLAN, M. P, HAZLEWOOD, G. P. β -1,4-D-Xylan - Degrading enzyme systems: biochemistry molecular biology and applications. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.17, p. 259-289, 1993.
- DAHLBERG, L., HOLST, O., KRISTJANSSON, J. K. Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.40, p.63-68, 1993.
- DANEALT, C., LEDUC, C., VALADE, J. L. The use of xylanases in kraft pulp bleaching: a review. **Tappi Journal**, v.77, n.6, 1994.
- DETROY, R. W. Bioconversion of agricultural biomass to organic chemicals. In: I. S. Goldstein (ed.). **Organic chemicals from biomass**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1981. p. 19-43.
- DUARTE, M. C. T., PORTUGAL, E. P., PONEZI, A. N., BIM, M. A.; TAGLIARI, C. V., FRANCO, T. T. Production and Purification of Alkaline Xylanases. **Bioresource Technology**, v.68, p.49-53, 1999.
- DURAN, N., ESPOSITO, E., ARAÚJO NETO, J. S. Enzimas de importância na indústria de polpa de celulose e papel. **O Papel**, dezembro, 68-85, 1995.
- ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology: three approaches to reduce the environmental impact of the pulp and paper industry. **Sci. Progress**, v.75, p.175, 1991.

- GAMERITH, G., STRUTZENBERG, H. Fate of hemicellulose during pulp and viscose fibre production and its use in xylanase production. **Progress in Biotechnology**. v.7, Xylans and Xylanases, p.339-348, 1992.
- GESSESSE A. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.9, p. 3533-3535, 1998.
- HAALAND, P. D. **Experimental Design in Biotechnology**. New York: Ed. Marcel Dekker, 1989.
- HALTRICH, D., PREISS, M. STEINER, W. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. **Enzyme Microbiol. Technol.** v.15, p. 854-860, 1993.
- IUPAC. Measurement of Cellulase Activities. **Pure & Appl. Chem.** v.59, p. 257-268, 1987.
- KHANNA, S. & GAURI Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. **Enz. Microb. Technol.** v.15, p. 990-995, 1993.
- KANTELINEN, A., HORTLING, B., RANUA, M., VIKARI, L. Effects of fungal and enzymatic treatments on isolated lignins and on pulp bleachability. **Holzforschung**, v.47, p. 29, 1993.
- KOPONEN, R. Pulp Paper Int'l. v.33, n. 11, p. 24, 1991.
- KUBATA, B. K., K. TAKAMIZAWA, K., KAWAI, T., SUZUKI H., HORITSU. Xylanase IV, an endoxylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 which produces xylotetraose as the only low-molecular-weight oligosaccharide from xylan. **Applied and Environmental Microbiology** v.61, p. 1666-1668, 1994.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

- LEATHERS, T. D. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. **Applied and Environmental Microbiology** v.52, p. 1026-1030, 1986.
- LEE, Y., LOWE, S. E., ZEIKUS, J. G. Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. **Applied and Environmental Microbiology** v.59, p. 763-771, 1993.
- LINKO, M., POUTANEN, K., VIKARI, L. New developments in the application of enzymes for biomass processing. In Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation. Coughlan, M. P., Ed., **Elsevier Applied Science**, London, 331p., 1989.
- MANDELS, N., STENBERG, D. Recent Advances in Cellulase Technology. **J. Ferment. Technol.** v.54, p.267-286, 1976.
- McCLEARY, B. V. Enzymatic modification of plant polyssacharides. **Int. J. Biol. Macromol.** v.8, p.349, 1986.
- MEDEIROS, J. F. Estudo do meio de cultura para produção de Lipases por *Geotricum sp.* Campinas: FEA – UNICAMP, 1999 (Dissertação de Mestrado).
- MILAGRES, A. M. F., LACIS, L. S., PRADE, R. A. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. **Enzyme Microbiol. Technol.** v.15, p.248-253, 1993.
- MILAGRES, A. M. F. **Produção de xilanases por *Penicillium janthinellum* e aplicação das enzimas no Branqueamento de Polpas Kraft**. Campinas: UNICAMP, 1994 (Tese de Doutorado).
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry** v.31, p.426-428, 1959.
- MUNK, N. Pulpzyme HC: 6 Stage ECF Bleaching. Novo Nordisk, 1993.
- NAKAMURA, S., NAKAI, R., WAKABAYASHI, K., ISHIGURO, Y., AONO, R., HORIKOSHI, K. Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkalophilic

- and thermophilic *Bacillus* species strain Tar-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** v.58, p. 78-81, 1994.
- NOE, P., CHEVALIER, J., MORA, F., COMTAT, J. Action of xylanases on chemical pulp fibers. Part-II. Enzymatic bleaching. **Journal Wood Chem. Technol.** v.6, p. 167, 1986.
- OKAZAKI, W., AKIBA, T., HORIKOSHI, K., AKAHOSHI, R. Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus spp.* **Agric. Biol. Chem.** v.49, p. 2033, 1985.
- PAICE, M. G., GURNAGUL, N., PAGE, D. H., JURASEK, L. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. **Enz. Microb. Technol.** v.14, p.272-276, 1992.
- PANBANGRED, W.; SHINMYO, A.; KINOSHITA, S., OKADA, H. Purification and Properties of Endoxylanase Produced by *Bacillus pumilus*. **Agric. Biol. Chem.** v.47, n.5, p.957-963, 1983.
- PELCZAR Jr., M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiology Concepts and applications**. McGraw-Hill, INC. 1993.
- POMMIER, J. C. **ATIP**. v.44, n.3, p. 125, 1990.
- RAIMABAULT, M., SOCCOL, C. R., CHUZEL, G. **International Training Course On Solid state Fermentation**. Sarl La Goutte D'Encre Editora, França, 1998, 204 p.
- RÄTTÖ, M., POUTANEN, K., VIIKARI, L. Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerant *Bacillus circulans* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.37, p.470-473, 1992.
- SAMAIN, E., TOUZEL, J. P., BRODEL, B., DEBEIRE, Ph. Isolation of a thermophilic bacterium producing high level of xylanase. **Progress in Biotechnology**. v.7, Xylans and Xylanases, p.467-469, 1992.

- SAMAIN, E., DEBEIRE, Ph., TOUZEL, J. P. High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain. **Journal of Biotechnology**. v.58, p. 71-78, 1997.
- SENIOR, D. J., HAMILTON, J. Biobleaching with xylanases brings biotechnology to reality: economic and environmental advantages of using xylanases in bleach plants catapult from the lab to the mill. **Pulp and Paper** (Sept) v.66, p. 111-114, 1992.
- SENIOR, D. J., HAMILTON, J., BERNIER, R. L. **Tappi Journal**. v.75, n.11, p.125, 1992.
- SENIOR, D. J. and HAMILTON, J. **Tappi J**. v.76, n.8, p. 200, 1993.
- SEWELL, G. W., ALDRICH, H. C., WILLIAMS, D., MANNARELLI, B., WILKIE, A., HESPELL, R. B., SMITH, P. H., INGRAM, L. O. Isolation and characterization of xylan-degrading strains of *Butyrivibrio fibrisolvens* from a Napier grass-fed anaerobic digester. **Appl. Env. Microbiol.** v.54, n.5, p. 1085-1090, 1988.
- SHOHAM, Y., SCHWARTZ, Z., KHASIN, A., GAT, O., ZOSIM, Z., ROSENBERG, E. Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6. **Biodegradation** v.3, p. 207-218, 1992.
- SKERKER, P. S., LABBAUF, M. M., FARELL, R. L., BEERWAN, N., MCCARTHY, P. Proceedings of the Tappi Pulping Conference, Boston, MA, 1-5 Novembro, Tappi Press: Atlanta, GA, 1992.
- STANBURY, P. F., WHITAKER, A. Principles of Fermentation Technology. Oxford, Pergamon, 1984.
- SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Growth and production of xylanolytic enzymes by the extreme thermophilic anaerobic bacterium *Thermotoga thermarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p. 671-676, 1996.
- TAGLIARI, C. V.; DUARTE, M. C. T. & FRANCO, T. T. Optimization of the production of alkaline xylanase from *Bacillus pumilus*. **Journal of the Brazilian Society of Microbiology**, 1999 (submission).

- TOLAN, J. S. Pulping Conference Proceedings, Book 1, p. 13, **TAPPI**, 1992.
- TOLAN, J. S., CANOVAS, R. V. The use of enzymes to decrease the Cl_2 requirements in pulp bleaching; Xylanase enzymes improve effectiveness of conventional chemical bleaching. **Pulp and Paper Canada**, v.93, n.5, p.39-42, 1992.
- TREMBLAY, L. & ARCHIBALD, F. Production of a cloned xylanase in *Bacillus cereus* and its performance in kraft pulp prebleaching. **Can. J. Microbiol.** v.39, p.853-860, 1993.
- TURNER, J. C., SKERKER, P. S., BURNS, B. J., et al. **Tappi J.** v.75, n.12, p. 83, 1992.
- VIKARI, L., RANUA, M., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., LINKO, M. IN: THIRD INT. CONF. BIOTECHNOL. PULP PAPER INDUSTRY. **Proceedings**, Stockholm, p. 67-69, 1986.
- VIKARI, L., RANUA, M., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., LINKO, M. Application of enzymes in bleaching. IN: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF WOOD AND PULPING CHEMISTRY. v.1, p. 151-154, Paris 27-30 April, 1987.
- VIKARI, L., SUNDQUIST, J., KETTUNEN, J. Xylanase enzymes promote pulp bleaching **Paperi ja Puu** v.73, p.384, 1991.
- VIKARI, L., KANTELINEN, A., RATTO, M. **Enzyme in pulp and paper processing**. ACS Symp. V.460, p. 12, 1991b.
- VIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J. e LINKO, M. Xylanases in bleaching: From na idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**. v.13, p.335-350, 1994.
- WONG, K. K. Y., TAN, L. U. L., SADDLER, J. N. Multiplicity of β - 1, 4- xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v.52, p.305-317, 1988.
- WONG, K. K. Y., SADDLER, J. N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. **Critical Reviews in Biotechnol.**, 1992.

- YANG, J. L., LOU, G., ERIKSSON, K. L. The impact of xylanase on bleaching of Kraft pulps. **Tappi J.** v.75, n.12, p. 95, 1992.
- YANG, J. L., CATES, D. H., SACON, V. M. Pulping Conference Proceedings, Book 3, p. 1033, **TAPPI PRESS**, Atlanta, 1993.
- YANG, V. W., ZHUANG, Z., ELEGIR, G. JEFFRIES, T. W. Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp isolated from Kraft pulp. **J. Ind. Microbiol.** v.15, p. 434-441, 1995.

ANEXOS

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE XILANASE
ALCALINA POR *Bacillus pumilus*

Trabalho apresentado no XII Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM.
Universidade Federal de Uberlândia 4 a 7 de agosto de 1998 e aceito para publicação na
revista JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY com o Título
OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION OF ALKALINE XYLANASE FROM *Bacillus*
pumilus.

PRODUCTION OF ALKALI-TOLERANT XYLANASES FROM *BACILLUS PUMILUS*

Cristiane V. Tagliari,^a Marta C. T. Duarte,^b Telma T. Franco^{a*}

^a Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

^b Centro de Pesquisas Quím., Biológ. e Agríc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

ABSTRACT

Active xylanases at high temperature and at alkaline pH, have great potential for industrial application, such as the bleaching process, without any need for cooling or changes in pH. Production of cellulase-free xylanase by *Bacillus pumilus* was enhanced by optimization of initial pH of the culture medium, the type and concentration of nitrogen source and the concentration of carbon source. The xylanase activity was studied at pH 9 and 55°C. Under these conditions, yields as high as 130 U/ml of culture medium were obtained.

Key words: Alkaline xylanase, production, *Bacillus pumilus*

INTRODUCTION

Hemicellulose is the second most abundant polysaccharide in plant cell walls, accounting for 10 to 30% of the dry weight of wood. Xylans, the major hemicellulose component, contain β -1,4-linked D-xylose backbones with arabinose, 4-O-methyl-D-glucuronic acid and acetic acid substituents (4).

Endo- β -1,4-xylanases, mainly responsible for the enzymatic hydrolysis of xylan, are excreted by numerous microorganisms (14). Xylanase production has been reported by *Bacillus* (11, 13), *Bacillus subtilis* (15), *Bacillus stearothermophilus* (3) and *Bacillus pumilus* (5, 12).

Cellulase-free xylanase can be used in the prebleaching of Kraft pulps, in order to reduce the amount of chlorine required to achieve a target pulps brightness (16) and consequently reduce the chloroorganics released in the effluent.

The aim of this work was to increase the xylanase yield by *Bacillus pumilus* to allow an industrial application.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and culture medium: *Bacillus pumilus* was isolated from soil and wood decomposition from Holambra, SP, Brazil (5). The microorganism was

maintained on birchwood xylan agar and subcultured monthly. The basic culture medium contained (8): xylan Birchwood (Sigma) (10 g/L); peptone (1.0 g/L); Tween 80 (1.0 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.4 g/L); KH_2PO_4 (2.0 g/L); uréia (0.3 g/L); CaCl_2 (0.3 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g/L) and trace of the following mineral solution: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5.0mg/L); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.6 mg/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.4 mg/L); CoCl_2 (2.0 mg/L). The initial pH was adjusted to 10 with 2N NaOH.

Enzyme production: For the xylanase production, 20% of inoculum (incubated in the basic culture medium at 40°C for 20 h) was transferred to 50 ml Erlenmeyer flasks containing 10 ml of the investigated culture medium. The cultures were incubated at 40°C in rotary shaker at 250 rpm. The fermented medium was centrifuged for 10 min at 12000g.

Xylanase assay: Xylanase activities were determined by measuring the reducing sugars liberated from Birchwood xylan (1%) homogeneously suspended in 100 mM glycine-NaOH buffer (1). The amount of reducing sugars were determined according to Miller (10). One unit (U) was defined as the quantity of enzyme required to liberate 1 μmol of xylose equivalent per minute at 55°C and pH 9.

Cellulase assay: Cellulase activities (FPase) were determined according to IUPAC Method (7). One unit (U) was defined as the quantity of enzyme required to liberate 1 μmol of glucose equivalent per minute at 50°C and pH 10.

Optimization of the xylanase production: The production of xylanases was studied by experimental design. In this study were investigated 4 factors (initial pH, xylan, ammonium sulphate and peptone concentration) in two levels (Table 1).

TABLE 1. Values studied in the experimental design

Factors	Level		
	-1	0	+1
Xylan (% w/v)	1.0	3.0	5.0
Peptone (% w/v)	0.1	0.6	1.1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% w/v)	0.05	0.15	0.25
pH	8.5	9.5	10.5

RESULTS AND DISCUSSION

Cellulase activity is unwanted for pulp and paper application, because it degrades cellulose fibers and destroys pulp properties. Cellulase activities was investigated by incubating the fermented broth with filter paper according to IUPAC Method, and the cellulase levels were found to below 0.009 U/ml. According to Milagres et al. (9) and Yang et al. (17), cellulase levels (FPase) were found to 0.17 U/ml and 0.5 U/ml respectively.

Xylanase production was studied by a fractionary experimental design with 4 factors and 4 central point in 2 levels (Table 2). This design resulted in 12 assays (2,6).

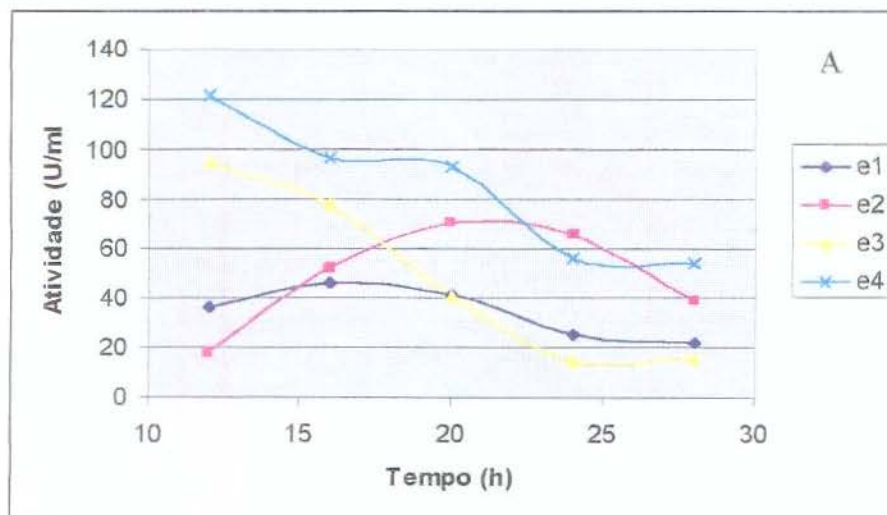
TABLE 2. Fractionary experimental design 2⁴⁻¹

Assay	xylan	peptone	(NH ₄) ₂ SO ₄	pH
1	1%	0,1%	0,05%	8,5
2	1%	0,1%	0,25%	10,5
3	1%	1,1%	0,05%	10,5
4	1%	1,1%	0,25%	8,5
5	5%	0,1%	0,05%	10,5
6	5%	0,1%	0,25%	8,5
7	5%	1,1%	0,05%	8,5
8	5%	1,1%	0,25%	10,5
9 *	3%	0,6%	0,15%	9,5
10 *	3%	0,6%	0,15%	9,5
11 *	3%	0,6%	0,15%	9,5
12 *	3%	0,6%	0,15%	9,5

* Central point

Figure 1 shows the results of this study of xylanase production. It was observed (Fig. 1-A) that higher level of production, 121 U/ml, was achieved in 12 h, showed in assay 4, which contained 1% xylan, 1.1% peptone, 0.25% ammonium sulphate and pH 8.5. In the Fig. 1-B was observed that higher level of production, 125 U/ml, was achieved in 24 h, showed in assay 7, which contained 5% xylan, 1.1% peptone, 0.05% ammonium sulphate and pH 8.5. For both assays the peptone concentration and the initial pH was 1.1% and 8.5 respectively. Thus, the xylanase production was influenced by this factors.

Although the greatest production of enzyme was attained with central point (130 U/ml in 20 h), which contained 3% xylan, 0.6% peptone, 0.15% ammonium sulphate and pH 9.5.



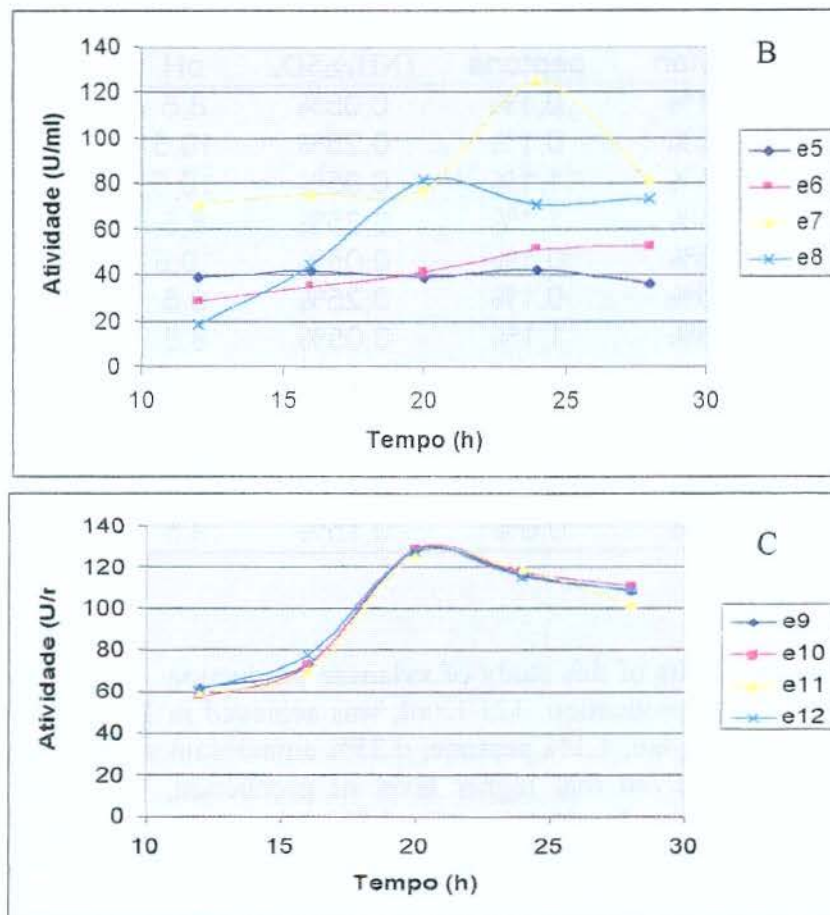


Figure 1. Time course of xylanases production. (A) assays with minimum xylan; (B) assays with maximum xylan; (C) central points

Figure 2 shows the time course of xylan consumption, xylanase activity and cellular concentration to the assay that contained the composition of the central point.

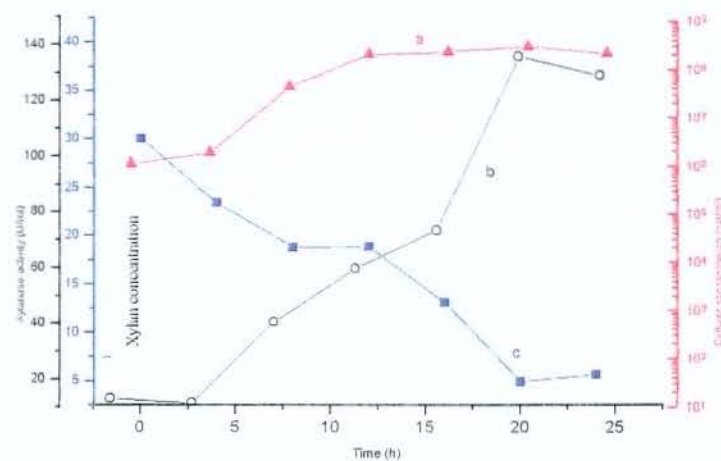


Figure 2. Time course profile of: a) cellular concentration; b) xylanase activity; c) xylan concentration

As can be observed in the Figure 2, xylanase activity profile was inversely proportional to the xylan concentration profile, and the maximum activity was found when all the substrate was consumed. Thus, it's probable that the time necessary for maximum production was influenced by initial xylan concentration.

This can be observed comparing the graphs in the Figure 1, where similar levels of production (among 120 and 130 U/ml) were found with minimum xylan concentration in 12 h as maximum xylan concentration in 24 h.

For this study, the better composition was showed by assay 4, because obtained higher xylanase production with minimum xylan concentration and less time.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

REFERENCES

1. Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal Of Biotechnology*, 23:257-270, 1992.
2. Barros Neto, B.; Scarminio, I.S. E Bruns, R.E. Planejamento e otimização de experimentos - Ed. Unicamp, Campinas, 1995.
3. Bezalel, L.; Shoham, Y.; Rosenberg, E. Characterisation and delignification activity of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 57-62, 1993.
4. Biely, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3: 286-290, 1985.
5. Duarte, M.C.T; Portugal, E.P.; Poneze, A.N.; Bim, M.A; Tagliari, C.V.; Franco, T.T. Production and purification of alkaline xylanases by partitioning in aqueous two-phase systems. *Bioresource technology*, 68: 49-53, 1999.
6. Haaland, P.D. Experimental design in biotechnology. Ed. Marcel Dekker, New York, 1989.
7. Iupac. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59: 257-268, 1987.
8. Mandels, N.; Stenberg, D. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.*, 54: 267-286, 1976.
9. Milagres
10. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428, 1959.
11. Nakamura, S.; Nakai, R.; Wakabayashi, K.; Ishiguro, Y.; Aono, R.; Horikoshi, K. Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* species Strain Tar-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58: 78-81, 1994.
12. Panbangred, W.; Shinmyo, A.; Kinoshita, S. Purification and properties of endo-xylanase produced by *Bacillus pumilus*. *Agric. Biol. Chem.*, 47 (5): 957-963, (1983).
13. Samain, E.; Debeire, Ph.; Touzel, J.P. High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* Strain. *Journal of Biotechnology*, 58: 71-78, 1997.

14. Senior, D.J.; Mayers, P.R.; Miller, D.; Sutcliffe, R.; Tan, L.; Saddler, J.N. Selective solubilisation of xylan in pulp using a purified xylanase from *Trichoderma harzarium*. *Biotechnol. Lett.*, 10: 907-912, (1988).
15. Takahashi, M.; Hashimoto, Y. *J. Ferment. Technol.*, 41:181, (1963).
16. Viikari, L.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *Fems Microbiol. Rev.*, 13: 335-350, 1994.
17. Yang

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE XILANASES ALCALINAS DE
Bacillus pumilus PARA APLICAÇÃO NO BRANQUEAMENTO DE
POLPAS DE PAPEL**

Trabalho aceito para apresentação oral no 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC 99. Universidade Federal do Rio de Janeiro 6 a 8 de outubro de 1999.

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE XILANASES ALCALINAS DE *Bacillus Pumilus* PARA APLICAÇÃO NO BRANQUEAMENTO DE POLPAS DE PAPEL

Cristiane V. Tagliari¹, Mônica A. Bim¹, Marta C. T. Duarte² e Telma T. Franco^{1*}

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, caixa postal 6066, 13081970, Campinas, SP. e-mail: franco@feq.unicamp.br *

²Laboratório de Microbiologia, CPQBA – UNICAMP, caixa postal 6171, 13081970, Campinas, SP.

Palavras chave: *Bacillus*, xilanases, purificação, fermentação, branqueamento.

Para reduzir os problemas ambientais, a indústria de papel e celulose vem buscando alternativas para seus processos de branqueamento através da tecnologia enzimática. Desta forma, xilanases tem sido empregadas durante o processo de pré-branqueamento de polpas Kraft, com intuito de diminuir a carga de cloro utilizada nas etapas subsequentes e, consequentemente, reduzir a quantidade de organoclorados no efluente.

O uso de enzimas para aumentar a deslignificação de polpas de papel foi inicialmente sugerido por Viikari *et al.* (1986), e revisado por vários autores, dentre eles Daneault *et al.* (1994), Duran *et al.* (1995) e Duarte *et al.* (1999).

Xilanases ativas em condições alcalinas e temperatura acima de 45°C possuem elevado potencial de aplicação em branqueamento de polpas de papel, já que podem ser introduzidas livremente nos diferentes estágios do processo sem a necessidade de drásticas etapas de resfriamento ou ajustes de pH. Bactérias são aptas a produzir enzimas xilanolíticas termoestáveis e tolerantes a álcali, o que torna atrativo o estudo da produção de xilanases por *Bacillus pumilus*.

Para viabilizar a aplicação de xilanases em larga escala é necessário que esta seja obtida com alta produtividade e baixo custo. Os principais objetivos deste trabalho foram otimizar as condições de produção de xilanases alcalinas por *B. pumilus* em fermentação submersa, extrair e purificar a enzima do caldo de fermentação utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) e aplicar as xilanases no branqueamento da polpa kraft de eucalipto.

O meio de cultivo foi investigado por planejamento estatístico, objetivando maximizar a produção de xilanases em frascos agitados. Após determinar as melhores condições de cultivo, um biorreator com volume útil de 2L foi utilizado para produzir a quantidade necessária de enzima para aplicação nos testes de branqueamento.

A purificação do caldo de fermentação foi desenvolvida por partição em SDFA e foram estudados os efeitos da concentração e da MM do PEG e das concentrações dos sais (K_2HPO_4 e NaCl).

A maior produção da enzima em frascos agitados foi 129 U/mL em 20 horas de fermentação, no ensaio composto por 3% de xilana, 0,6% de peptona, 0,15% de sulfato de amônio, pH 9,5 e 40°C (Figura 1).

Para a produção de xilanases no bioreator com a mesma composição, a atividade máxima foi de 173.30 U/mL (a pH 9 e 55 °C) em 10 horas de fermentação, alcançando uma produtividade maior do que a obtida em frascos agitados, 17.33 U.mL⁻¹.h⁻¹.

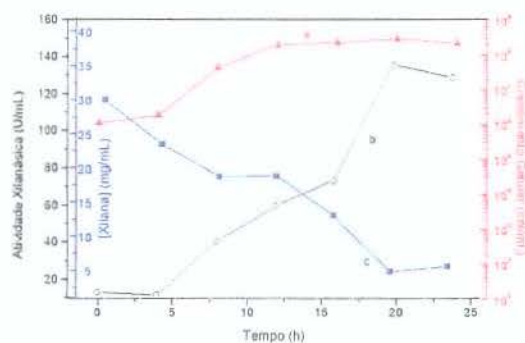


Figura 1: Produção de xilanases: a) crescimento celular; b) atividade xilanásica; c) consumo de xilana

O melhor sistema para a purificação de xilanases foi o composto por 22% de PEG 6000, 10% de K_2HPO_4 e 12% de NaCl com um fator de purificação de 40 vezes e 97% de rendimento (Tabela 1).

Tabela 1: Coeficientes de partição (K), fatores de purificação (FP) e rendimento (R) obtidos no SDFA

Atividade (U/mL)	K		Purificação (FP)		Rendimento %	
	enzima	proteína	topo	fundo	topo	fundo
topo fundo						
171	5,7	30,1	40,1	0,1	97	3

Quanto a aplicação da enzima no branqueamento de polpas Kraft, foi verificado uma redução de 2,5 unidades no número Kappa, sem afetar a viscosidade da polpa quando esta foi tratada com xilanases na dosagem de 50U/g polpa seca, o que representa uma eficiência de deslignificação de 26%. Este resultado foi superior aos encontrados na literatura, evidenciando assim, o potencial desta enzima para aplicação em branqueamento de polpas de papel.

Agradecimentos: FAPESP, CAPES e Champion Papel e Celulose LTDA.

VIKARI, L., *et al.* In: Third Int. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Industry. **Proceedings**, Stockholm, p. 67-69, 1986.

DANEULT, C., *et al.* The use of xylanases in kraft pulp bleaching: a review. **Tappi Journal**, v.77, n.6, 1994.

DUARTE, M. C. T., PORTUGAL, E. P., PONEZI, A. N., BIM, M. A.; TAGLIARI, C. V., FRANCO, T. T. Production and Purification of Alkaline Xylanases. **Bioresource Technology**, v.68, p.49-53, 1999.

DURAN, N., *et al.* Enzimas de importância na indústria de polpa de celulose e papel. **Revista de Engenharia de Alimentos**, 1998.

**PURIFICATION OF ALKALINE XYLANASE BY LIQUID-LIQUID
EXTRACTION IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS.**

Trabalho apresentado no Quinto Simpósio Brasileiro sobre química de ligninas e outros componentes da madeira. Curitiba, 31 de agosto a 5 de setembro de 1997 e publicado na revista **BIORESOURCE TECHNOLOGY** com o Título **PRODUCTION AND PURIFICATION OF ALKALINE XYLANASES** (v.68, p.49-53, 1999).

Production and purification of alkaline xylanases

M.C.T. Duarte^a, E.P. Portugal^a, A.N. Ponezi^a, M.A. Bim^b, C.V. Tagliari^b,
T.T. Franco^{b*}

^aCPQBA/UNICAMP, PO Box 6171, Campinas 13081-970, SP, Brazil

^bFEQ/UNICAMP, PO Box 6066, Campinas 13081-970, SP, Brazil

Received 5 September 1997; revised 15 December 1997

Abstract

This work investigated more than 500 colonies with xylanolytic activity which were able to grow in a medium containing corn xylan as the only carbon source. Out of the 500 colonies, 22 microorganisms were also able to grow in birchwood xylan and were cellulase-free producers. The xylanase activity was studied at pH 10.0 and pH 5.0. It was observed that the three best producers of alkaline xylanase yielded enzyme levels in the range of 2.6 to 4.0 U/ml. Enzyme levels of 1.0 to 1.25 U/ml were achieved by four other microorganisms. Conversely, there were three microorganisms that produced a xylanase which was mostly active at pH 5.0. There was just one microorganism able to produce an enzyme active at pH 10.0.

The alkaline xylanases from crude fermentation broth were extracted in aqueous two-phase systems (ATPS) composed of 16% polyethyleneglycol (PEG 6000) and 8% phosphate salt. A purification factor of 57 and a 41% yield of enzyme activity were achieved for the system containing 16% PEG 6000, 8% K₂HPO₄ and 12% NaCl. © 1998 Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Alkaline xylanases; *Bacillus pumilus*; Enzyme purification; Aqueous two-phase systems; Protein partitioning; Downstream processing

1. Introduction

Extremophilic enzymes, which are active under alkaline conditions and higher temperatures, have great potential for industrial application, such as the bleaching process, without any need for cooling or changes in pH (Shoham *et al.*, 1992). In the case of agrofiber or kraft processing, enzyme preparations with low cellulase activity are also desirable. Currently, most of the commercially available xylanases have been produced by fungi and are active at neutral or acidic pHs and their optimum temperatures for activity are below 45°C.

The polysaccharide xylan comprises the major part of the hemicellulose fraction of many plant materials. It is mainly formed by heteropolysaccharides of a chain of β -1,4-linked D-xylanopyranose units highly substituted mostly by acetyl, arabinosyl and glucopyranosyl residues (Aspinall, 1980). Xylanases are important enzymes for the degradation of plant materials and for releasing the readily assimilable carbon sources.

The xylan chemical modification by xylanases can be used for several different applications which require lignocellulolytic bioconversion, such as paper and cellulose production and textile, food and feed industrial processes (Milagres & Prade, 1993; Silva *et al.*, 1994).

Purification of target proteins requires their separation from the media or from the raw extract used for the maintenance of the biomolecules. The product is usually present at low levels and also needs to be concentrated. Protein extraction in aqueous two-phase systems (ATPS) is a rapid procedure which avoids most of the problems of denaturing fragile molecules in chromatographic beads. ATPS provide a gentle environment for biologically active proteins and may be employed on a large scale (Kula, 1990). In order to have a high yield, recovery and also a good purification factor for a target protein, a composition of the ATPS has to be selected to quantitatively extract the desirable protein from one of the phases with minimal concentration of contaminant molecules (Franco *et al.*, 1996).

The purpose of this work was to isolate bacteria able to produce alkaline xylanases, and to characterize and purify the enzymes. Two isolates (B and I) identified as

*Corresponding author.

Bacillus pumilus produced the highest xylanase activity and they were cellulase-free. Despite belonging to the same species, they were characterized as different strains. Xylanase isolated from *B. pumilus* was purified in an aqueous two-phase system composed of PEG 6000 and K_2HPO_4 . The effect of NaCl concentration (3, 6, 9 and 12% w/w) in improving the recovery of xylanase was also investigated.

2. Methods

2.1. Materials

Polyethylene glycol (PEG 6000, Synth, Brazil), potassium phosphate dibasic and sodium chloride (Ecibra, Brazil). Birchwood xylan (Sigma, USA) was used as the substrate. All other chemical and biochemical reagents used were of an analytical grade.

2.2. Screening of microorganisms

Microorganisms with xylanolytic activity were isolated from several sources of soil and wood decomposition material from Holambra, SP, Brazil. The isolates were screened and maintained on corn xylan agar and subcultured monthly. The xylanase was screened for using 1% xylan in 1.5% agar overlaid on Petri dishes. Xylanases-producing bacteria created clear halos around colonies on xylan plates. The screening for cellulase-free microorganisms was done using 1% carboxymethylcellulose (CMC) in 1.5% agar overlaid on Petri dishes. Cellulase activity was detected by staining the CMC plates with 1% Congo red in water for 15 min while shaking. The plates were rinsed with 1 M NaCl and colonies expressing cellulase appeared as clear zones (Tremblay & Archibald, 1993). After fermentation, this was confirmed by cellulase activity in filtrates according to the IUPAC method (Ghose, 1987).

2.3. Enzyme production

For the enzyme production, the isolated microorganisms previously incubated for 48 h were transferred to 50 ml Erlenmeyer flasks containing 7 ml of the following culture medium (Mandels & Stenberg, 1976): xylan Birchwood (Sigma), 10.0 g; peptone, 1.0 g; Tween 80, 1.0 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.4 g; KH_2PO_4 , 2.0 g; urea, 0.3 g; $CaCl_2$, 0.3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.0 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1.6 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.4 mg; $CoCl_2$, 2.0 mg; distilled water to 1000 ml; adjusted to pH 10 with 2 N NaOH. Fermentation was carried out for 48 h at 45°C. The fermented medium was centrifuged for 15 min at 12,000g and filtered in 0.22 μ m Millipore membrane.

2.4. Determination of xylanase activity and stability

Enzyme activities at pH 5 were determined according to Bailey et al. (1992) and the amount of reducing sugars was determined according to Miller (1959), and activities at pH 10 were measured under the same standard assay conditions, replacing the previous buffer by 100 mM glycine–NaOH buffer at 45°C. Enzyme stability was determined by measuring xylanase activity of samples previously incubated at pH 10 at 45°C. Xylan from birchwood (Sigma) was used as substrate. One unit of xylanase activity was defined as 1 μ mol of xylose produced per minute under the given conditions.

2.5. Aqueous two-phase systems preparation

5 g of 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 (w/w) systems was prepared in test tubes in duplicate from stock solutions of 40% polyethyleneglycol (PEG) 6000 and 40% w/w dipotassium hydrogen phosphate (w/w). Solid NaCl was added when necessary and the remainder was fermented broth. The aqueous systems were mixed with a Vortex for 1 min. Phase separation was achieved by centrifugation for 3 min at 3000g.

2.6. Partitioning of total proteins

50 to 100 μ l of the top phase was transferred from each prepared system to a cuvette containing 2.4 ml of water and 1.0 ml of Coomassie blue solution, according to Sedmak & Grossberg (1977). It was mixed well and the A_{595} was read with a spectrophotometer, against a blank which had 50 μ l of a top phase of a system which had been equally prepared without any sample. The procedure was repeated for the bottom phase of each system and a BSA standard curve was used to calculate protein concentration. The partition coefficient, K , was calculated as the ratio of protein in the top phase to that in the bottom phase at room temperature.

2.7. Xylanase partitioning

A known volume of each phase of the ATPS was transferred for the measurement of the enzyme activity. The ratio of the activity in the top phase to the enzyme activity in the bottom phase was calculated.

2.8. Electrophoresis

SDS electrophoresis was carried out in 12% homogeneous gel (Laemmli, 1970) in the Mini-Protein II system (Biorad). The staining was carried out in Blue Coomassie R-250. The standard markers used for MW were from Pharmacia: phosphorylase b (94,000).

bovine serum albumin (BSA, 67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,400).

3. Results and discussion

In order to produce alkaline xylanase, 500 microorganisms from different soil sources were screened in corn xylan-containing culture media at pH 10.0 at 45°C. 75 isolates were able to grow and to create clear halos on corn xylan plates and only 22 produced clear halos on birchwood xylan plates. As they had also been incubated on CMC plates, with carboxymethylcellulose as the only carbon source, the 22 microorganisms chosen for investigation in this work were cellulase-free producers. Cellulase activity was also investigated by incubating the filtered fermented broth with filter paper according to IUPAC, and the cellulase levels were found to be below 0.009 U/ml.

Xylanase activity was determined at pH 10.0 because of the similarity of these pH conditions with the bleaching process for paper and cellulose. The activity assays at pH 5.0 were carried out for comparison with the fungal enzymes which are mostly active at neutral or acidic pHs according to the literature (Dahlberg et al., 1996).

It was observed that the best producers of alkaline xylanase were microorganisms B, I and K which yielded enzyme levels from 2.6 to 4.0 U/ml (Fig. 1). The isolates B, I, K and L were identified as different strains of *Bacillus pumilus*.

Enzyme levels of 1.0 to 1.25 U/ml were achieved by microorganisms L, M, R and S. In contrast, microorganisms N, O and P produced xylanases which were mostly active at pH 5.0. It is important to notice that microorganism L was able to produce an enzyme which was only active at pH 10.0. The behaviour of the latter microorganism suggests that a different enzyme may

have been produced by L, which did not degrade xylan at pH 5.0 or become unstable at this pH. The enzyme production profile observed for the B, I, K, M, N, O, P, R and S microorganisms may indicate the formation of two different enzymes, one of which would be most active at acidic pH and the other at alkaline pH. However, it can also indicate the production of enzymes with completely different structures.

Table 1 reports the specific activity of the alkaline xylanases.

Figure 2 illustrates the SDS-PAGE electrophoresis of the main proteins excreted by microorganisms S, M and N and Fig. 3 shows the gel of the extracellular proteins of microorganisms K, B and L. Electrophoresis gel of a blank of culture medium before fermentation has not shown any protein bands. The molecular weight of the main protein bands was estimated to be about 78,900, 63,800, 24,500 and 15,500 Da.

For enzyme purification, the production of alkaline xylanases and of total proteins by *B. pumilus* was monitored every 4 h. Maximum xylanase activity was achieved at 24 h of cultivation and after that the xylanase level decreased. The specific activity in the fermented broth was 0.97 U/mg of protein.

The stability of xylanase from microorganism I was investigated at pH 10.0 in order to verify the suitability of the enzyme for the bleaching process of alkaline cellulose pulps. It was observed that the xylanase relative stability was reduced to 75% after incubation at 45°C for 30 min and remained above 65% after 80 min of incubation in these conditions. Stability assays of xylanases produced by the other microorganisms are currently being investigated.

In order to purify the alkaline xylanase, the fermentation broth from microorganism I was mixed with PEG 6000 and phosphate at pH 10.0, since this enzyme is able to hydrolyse xylan at this pH. The final composition of the ATPS was 16% PEG 6000 and 8% K_2HPO_4 .

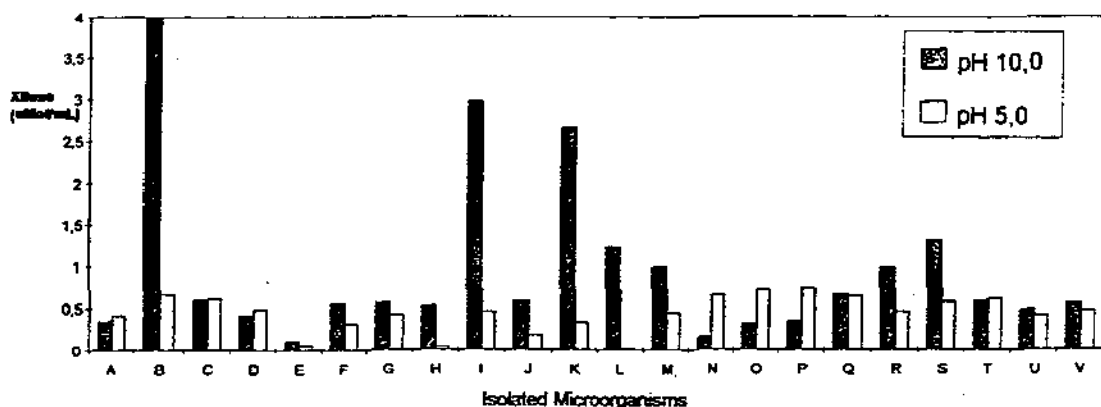


Fig. 1. Xylanase activity of 22 isolates at pH 5.0 and 10.0 at 45°C.

Table 1

Xylanase activity, extracellular protein and specific activity of the best xylanase producers strains

Strain	Xylanase activity (U/l)	Protein (mg/l)	Specific activity (U/mg)
B	3983	96.9	41.1
I	2981	94.1	31.7
K	2659	93.4	28.5
L	1228	97.1	12.7
M	978	88.5	11.1
N	143	128.6	1.1
O	310	89.7	3.5
S	1312	75.8	17.1

and the enzyme concentration was 183 U/l of aqueous system.

Table 2 shows the influence of NaCl concentration upon the xylanase and protein partition coefficients. It

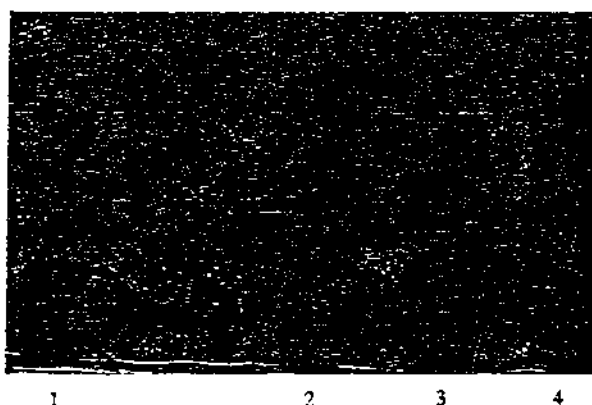


Fig. 2. SDS-PAGE of fermented media by isolates S, I and N. Lane 1: molecular markers. Lane 2: strain S. Lane 3: strain I. Lane 4: strain N.

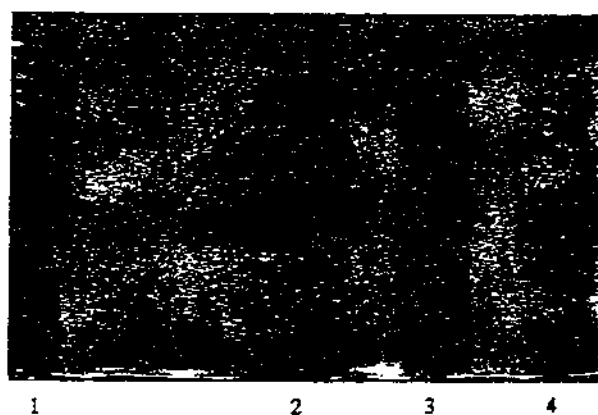


Fig. 3. SDS-PAGE of fermented media by isolates K, B and L. Lane 1: molecular markers. Lane 2: strain K. Lane 3: strain B. Lane 4: strain L.

Table 2

Effect of NaCl concentration upon the partition coefficient of the xylanase and of total proteins in the 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 aqueous system

%NaCl	$K_{xylanase}$	$K_{protein}$
0	0.7	0.3
3	2.5	2.7
6	6.9	5.3
9	3.0	2.0
12	0.7	108

was observed that xylanase partitioned towards the bottom phase in the absence of NaCl and in systems containing 6 and 12% NaCl and that it partitioned towards the top phase in systems containing 3 and 9% NaCl. However, the xylanase partition coefficient was affected less by the addition of NaCl to the ATPS than the total proteins. The partition coefficient of the total proteins was strongly influenced by NaCl concentration. The K value of the protein was raised from 0.3 to 108 in systems in the absence of NaCl and in systems containing 12% NaCl, respectively.

The results of the purification of *B. pumilus* xylanase are summarised in Table 3. Figure 4 clearly shows that the best separation of the enzyme from the contaminant material is achieved in PEG 6000/phosphate systems with 12% NaCl. As the enzyme partitions towards the bottom phase and the contaminant proteins (total proteins) were mainly collected in the top phases of the systems composed of 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 +12% NaCl, the purification factor was increased 57-fold in a single-step operation. The xylanase yield in the bottom phase was 41%. Material isolated from the top and from the bottom phases of PEG 6000/phosphate+12% NaCl was applied into SDS electrophoretic gels. Figure 5 shows that the top phase contained most of the contaminant proteins (large number of protein bands) and that the bottom phase only contained two main protein bands. This figure expresses the potential application of partitioning the fermented broth for the primary purification of

Table 3

Enzyme and protein yield and purification factor of *Bacillus pumilus* (strain I) xylanase in the 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 aqueous system

% NaCl	Enzyme yield		Protein yield		Enzyme purification factor	
	Top	Bottom	Top	Bottom	Top	Bottom
0	64	58	37	87	1.73	0.67
3	130	45	66	16	1.96	2.90
6	56	50	82	12	0.69	4.16
9	172	46	94	16	1.85	1.25
12	41	41	114	0.8	0.36	57

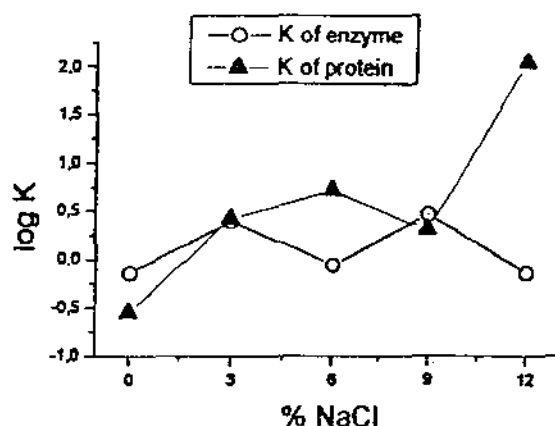


Fig. 4. Effect of NaCl upon xylanase and total proteins partition coefficients in the 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 aqueous system.

alkaline xylanase, since a significant reduction of contaminants was achieved in a single-step procedure. Current experiments are being carried out to investigate the effect of PEG molecular weight upon purification of the enzyme.

Gaikaiwari *et al.* (1996) have separated xylanase from *Bacillus* sp in ATPS by using two-step operations: the first in 8% phosphate and 16% PEG 8000 and the second in 12% phosphate and 8% PEG 8000 with a 1.2 purification factor and an 85% yield of enzyme activity.

4. Conclusion

Out of 500 microorganisms, 22 isolates were able to grow and produce clear halos in softwood and

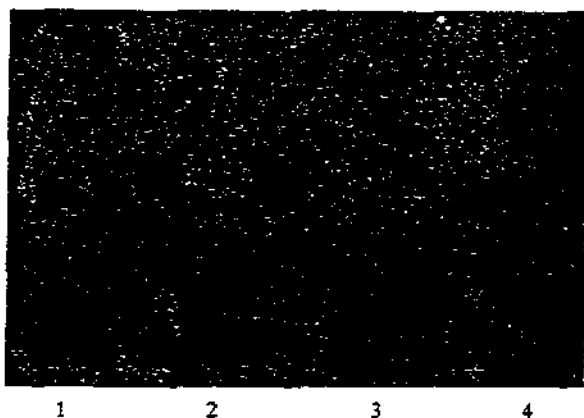


Fig. 5. SDS-PAGE of purification step in ATPS. Lane 1: molecular markers. Lane 2: fermentation broth. Lane 3: bottom phase. Lane 4: top phase.

hardwood xylan media, as the only carbon source. The best producers were identified as four different strains of *B. pumilus*. Amongst all isolates, *B. pumilus* B was the best producer of alkaline xylanase. The specific enzyme activity of isolate B was 41.1 U/mg of extra-cellular protein.

The ATPS composition of 8% K_2HPO_4 , 16% PEG 6000 and 12% NaCl has proved to be an excellent system for the concentration and purification of the xylanase in a single-step operation. A purification factor of 57 and 41% of enzyme yield were achieved in the bottom phase of this system.

References

- Aspinall, G.O., 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides. In *The Biochemistry of Plants. Carbohydrates: Structure and Function*, Press, J. (Ed.), Vol. 3, pp. 473–500. Academic Press, New York.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 23, 257–270.
- Dahlberg, L., Holst, O., Kristjansson, J.K., 1996. Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 63–68.
- Franco, T.T., Andrews, A.T., Asenjo, J.A., 1996. Use of chemically modified proteins to study the effects of single protein characteristics in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 300–308.
- Gaikaiwari, R., Shendye, A., Kulkarni, N., Rao, M., 1996. Two-phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly(ethylene glycol)– K_2HPO_4 system. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 23, 237–241.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59(2), 257–268.
- Kula, M.R., 1990. Trends and future of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation* 1, 181–189.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Mandels, N., Stenberg, D., 1976. Recent advances in cellulase technology. *Journal of Fermentation Technology* 54, 267–286.
- Milagres, A.M.F., Prade, R.A., 1993. Characterization of xylanase production by local isolated *Penicillium janthinellum*. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 248–253.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.
- Sedmak, J.J., Grossberg, S.E., 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry* 79, 544–552.
- Silva, R., Yim, D.K., Park, Y.K., 1994. Application of thermostable xylanases from *Hemicella* sp for pulp improvement. *Journal of Fermentation Bioengineering* 77(1), 109–111.
- Shoham, Y., Schwartz, Z., Khasin, A., Gat, O., Zosim, Z., Rosenberg, E., 1992. Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6. *Biodegradation* 3, 207–218.
- Tremblay, L., Archibald, F., 1993. Production of a cloned xylanase in *Bacillus cereus* and its performance in kraft pulp prebleaching. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 853–860.

**OPTIMISATION AND EXTRACTION OF AN ALKALINE XYLANASE
PRODUCED OF *Bacillus pumillus*.**

**Trabalho apresentado no Fifth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, 30 de
Agosto – 2 de Setembro, 1998, Aveiro – Portugal**



Fifth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp

Advances in Lignocellulosics Chemistry
for Ecologically Friendly
Pulping and Bleaching Technologies

August 30 - September 2, 1998

PROCEEDINGS



University of Aveiro
PORTUGAL

OPTIMIZATION AND EXTRACTION OF AN ALKALINE XYLANASE PRODUCED OF *Bacillus pumilus*

Bim¹, M. A.; Tagliari¹, C. V.; Duarte², M. C. T.; Portugal², E. P.; Ponezi², A. N. and Franco¹, T. T.
¹ Biochemical Engineering Laboratory, Chemical Engineering - UNICAMP PO.Box 6066
² Microbiology Laboratory, CPQBA - UNICAMP, PO. Box 6171.
 Campinas-SP 13081-970 -Brazil

ABSTRACT

Most of the xylanases commercially available produced by fungi are active at neutral or acidic pH and their optimum temperature for activity is below 45°C. Extremophilic xylanases which are active at alkaline conditions have great potential for industrial application as a bleaching process without any need for changes in pH.

The best composition of the culture media for maximisation of the alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* able to hydrolyse birchwood xylan at pH 10 at 45°C was 3% xylan and 0.6% peptone, the highest enzyme activity was around 33.0U/mL. The enzyme from crude fermentation broth was extracted in aqueous two phase systems (ATPS). An experimental design was used to study the effects of polyethyleneglicol (PEG) molecular weight (MW) and PEG, phosphate and sodium chloride concentrations on xylanase recovery and purification factor. A purification factor of 33 and a 98% enzyme recovery were achieved for the system containing 22% PEG 6,000, 10% K₂HPO₄ and 12% NaCl.

I. INTRODUCTION

Many microorganisms exhibit a complex system of enzymes involved in the degradation of hemicellulose. Xylan can be enzymatically hydrolyzed to xylose by xylanase and β -xylosidase.

The large number of potential applications of these enzymes in several fields is one of the main reasons for the investigation of fungal and bacterial xylanase production. Xylanases have also gained increasing attention as an aid to chemical pulp bleaching (Paice et al., 1984; Biechy, 1985; Viikari et al., 1994). Extremophilic enzymes active at high temperatures and alkaline pH have great potential as they can be introduced at different stages of the bleaching process without needing changes in pH or temperature (Shoham et al., 1992).

Purification of target proteins requires their separation from the media or from the raw extract used for the maintenance of the biomolecules. Protein extraction in aqueous two-phase systems (ATPS) is a rapid procedure which avoids most of problems of denaturing fragile molecules in chromatographic beads. ATPS provide a gentle environment for biologically active proteins and may be employed on a large scale (Kula, 1990).

The aim of this work was to optimise the composition of the culture media for the production of xylanase by *Bacillus pumilus* S₂, and to extract the enzyme from crude fermentation broth in ATPS.

II. EXPERIMENTAL

Materials: Polyethyleneglycol (PEG 6,000, Synth, Brazil), potassium phosphate dibasic and sodium chloride (Ecibra, Brazil). Birchwood xylan (Sigma, USA) was used as the substrate. All other chemical and biochemical reagents used were of an analytical grade.

Microbial strain - *B. pumilus* S₂ previously isolated from wood decomposition material was maintained on xylan agar and subcultured monthly.

Enzyme production - For the enzyme production, the microorganism previously incubated for 48h was transferred to 50 mL Erlenmeyer containing 10 mL of the following culture medium which was formulated according to Mandels and Stenberg, (1976): xylan Birchwood (Sigma) and peptone, various concentrations according to the experimental design; Tween 80, 1.0; (NH₄)₂SO₄, 1.4g; KH₂PO₄, 2.0; urea, 0.3g; CaCl₂, 0.3g; MgSO₄·7H₂O, 0.3g; FeSO₄·7H₂O, 5.0 mg; MnSO₄·H₂O, 1.6 mg; ZnSO₄·7H₂O, 1.4 mg; CoCl₂, 2.0 mg; distilled water to 1000 mL; adjusted to a pH 10.0 with NaOH 2N. Fermentation was carried out for 24h at 45°C. The fermented media was centrifuged for 15 min at 12000 x g.

Determination of xylanase activity - Enzyme activities were determined according to Bailey et al. (1982) with Birchwood xylan 1% solution in 100 mM glycine-NaOH buffer, pH 10.0 at 45°C. The amount of reducing sugars were determined according to Miller (1959). One unit of xylanase activity was defined as 1 μ mol of xylose produced per minute under the given conditions.

**PRODUCTION AND PURIFICATION OF AN ALKALINE XYLANASE
USING AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS.**

**Trabalho apresentado no IV Iberian Congress on Biotechnology - BIOTEC'98,
12 a 15 de Julho, 1998. University of Minho - Guimarães, Portugal.**

Experimental design - To determine the ideal concentration of xylan and peptone in the fermentation media of *B. pumilus* to enzyme production, a complete factorial design with five coded levels was performed, according to Haaland (1989) and Barros Neto (1993). The levels of the variables studied were determined from preliminary tests (Table 1). An other experimental design was applied to determine the best ATPS to extract the xylanase (Table 2)

Statistical analysis: Statistica for Windows, version 5.0A, was used for the regression analysis of the experimental data obtained. The quality of the fit of the polynomial model equation was expressed by the coefficient of determination R^2 , and its statistical significance was determined by an F-test.

Table 1. Assigned concentrations of variables at different levels

Factor	Levels				
	- α	-1	0	+1	+ α
Xylan (g/100mL)	0,17	1,0	3,0	5,0	5,83
Peptone (g/100mL)	0,034	0,2	0,6	1,0	1,17

Table 2. Factors studied in ATPS using a fractionated experimental design 2^{4-1}

Factor	Real Values of Levels		
	-1	0	1
PEG MW (Da)	1500	4000	6000
PEG concentration (%)	16	19	22
Phosphate concentration (%)	10	11,5	13
NaCl concentration (%)	0	6	12

Aqueous two-phase systems preparation: Ten grams of the ATPS which compositions are shown in Table 2 were prepared in test tubes in duplicate. The aqueous systems were mixed with a Vortex for 1 min. Phase separation was achieved by centrifugation for 5 min. at $3,000 \times g$.

Partitioning of total proteins: 500 μ L of the top phase was transferred from each prepared system to a cuvette containing 1000 μ L of water and 1.5 mL of Coomassie blue solution, according to Sedmak and Grossberg (1977). It was mixed well and the A_{595} was read with a spectrophotometer, against a blank which had 500 μ L of a top phase of a system which had been equally prepared without any sample. The procedure was repeated for the bottom phase of each system and a BSA standard curve was used to calculate protein concentration. The partition coefficient, K_{protein} , was calculated as the ratio of protein in the top phase to that in the bottom phase at room temperature.

Xylanase partitioning: A known volume of each phase of the ATPS was transferred for the measurement of the enzyme activity. The ratio of the activity in the top phase to the enzyme activity in the bottom phase was calculated (K_{enzyme})

III. RESULTS AND DISCUSSION

In preliminary experiments, xylan, peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KH_2PO_4 were tested for their suitability to sustain good production of xylanase activity by *B. pumilus*. The results indicated that xylan and peptone are the most important factors on the formation of xylanase activity and were chosen for this study. The design of the experiments and the experimental results is given in Table 3.

Table 3. Experimental design and results of the xylanase activity obtained for *B. pumilus*

Assay	Xylan (g/100mL)	Peptone (g/100mL)	Activity (U/mL)
1	1,0	0,2	10,1
2	1,0	1,0	12,4
3	5,0	0,2	11,0
4	5,0	1,0	13,7
5	0,17	0,6	2,8
6	5,83	0,6	18,3
7	3,0	0,034	4,8
8	3,0	1,17	22,3
9 (c)	3,0	0,6	38,9
10 (c)	3,0	0,6	31,3
11 (c)	3,0	0,6	29,6

(c) = central point

The experimental results were fitted with a second-order polynomial function and submitted to the analysis of surface response. The model equation obtained and the surface response graphic for *B. pumilus* is presented in Figure 1. The statistical significance of the second-order model equation was checked by an F-test.

The analysis of variance applied showed that this model is significant at a confidence level of 95%, indicating that the enzyme activity responded to concentration changes of xylan and peptone. The fit of this model was also expressed by the coefficient of determination R^2 , which was 89%.

The maximum activity was 33.0U/mL obtained at the central point (3% xylan and 0.6% peptone). The optimum xylan concentration was three times higher than original media, which had 1% xylan, the enzyme activity also increased in the same proportion (Table 3). *B. pumilus* exhibit good enzyme activity on the pH and temperature studied. According to Silva et al. (1994) *Humicola* sp produced 23U/mL of xylanase at pH 5.0 and 50°C.

The optimisation of ATPS aims high efficiency for enzyme recovery without affecting biochemical properties. Therefore the xylanase was mostly partitioned in the top PEG-rich phase in the 12 investigated systems (Table 4).

Table 4. Compositions of the investigated ATPS and partition coefficients of xylanase (K_{enzyme}) and of contaminant proteins (K_{protein})

Assay	ATPS composition				K_{enzyme}	K_{protein}
	PEG MW	% PEG	% phosphate	% NaCl		
1	1500	16	10	0	24.1	1.9
2	1500	16	13	12	9.2	1.4
3	1500	22	10	12	1.1	2.6
4	1500	22	13	0	27.5	0.8
5	4000	16	10	12	36.6	0.3
6	4000	16	13	0	2.0	4.3
7	4000	22	10	0	2.2	2.6
8	4000	22	13	12	0.5	0.3
9	6000	16	10	0	5.1	0.3
10	6000	16	13	12	15.2	3.5
11	6000	22	10	12	46.9	0.1
12	6000	22	13	0	23.8	1.0

The experimental design showed that the increase of molecular weight of PEG (from 1500 to 6000) raised the partition coefficient of the enzyme. In the same way, the increase of the concentration of NaCl from 0 to 12% contributed for the increase of K_{enzyme} (Figure 2).

Another important point to be observed in order to have an effective purification factor is that the contaminant proteins should be extracted in the opposite phase to the target enzyme. Therefore, for a high value of K_{enzyme} it is necessary a small value of K_{protein} , and vice-versa.

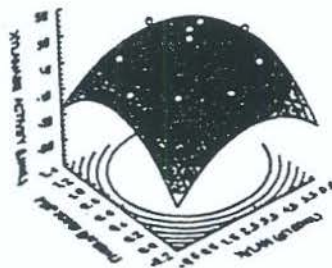


Figure 1 - Effect of xylan and peptone concentration on alkaline xylanase production

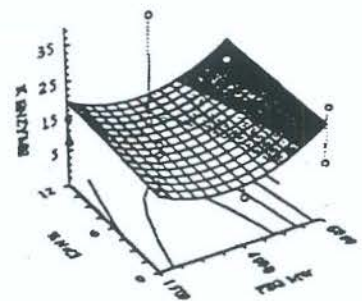


Figure 2- Effect of PEG MW and NaCl concentration on partitioning xylanase

Figures 3 and 4 show that the contaminant proteins partition into the bottom salt-rich phase with the highest PEG molecular weight, with the highest NaCl concentration and with the lowest phosphate concentration. The $K_{\text{partition}}$ decreased from 2.5 to 0.5 replacing PEG 1,500 by PEG 6,000, 0% NaCl by 12% NaCl and 13% phosphate by 10% phosphate.

The best ATPS to purify xylanase was composed by 22% PEG 6,000, 12% NaCl and 10% phosphate with 98% enzyme recovery and a purification factor of 33. Gaikawari et al. (1996) also used ATPS to purify xylanase, although they reached only a purification factor of about 2.6 with 98% enzyme recovery.

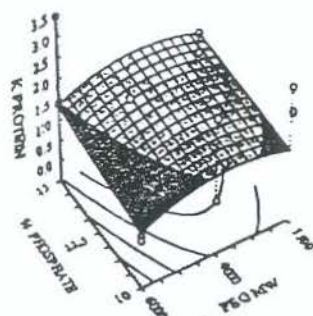


Figure 3- Effect of PEG MW and phosphate concentration on partitioning of contaminant proteins.

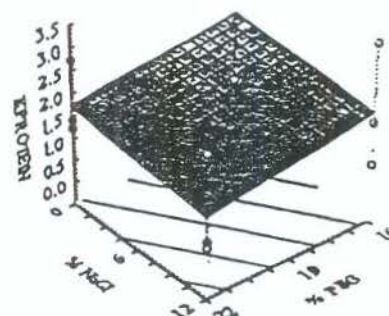


Figure 4- Effect of PEG and NaCl concentrations on partitioning of contaminant proteins

IV. CONCLUSION

B. pumilus exhibited good potential to produce alkaline xylanase (pH 10) at 45°C, which are appropriate conditions for bleaching process.

The ATPS composition of 22% PEG 6,000, 13% K_2HPO_4 and 12% NaCl has proved to be an excellent system for the concentration and purification of the xylanase in a single-step operation. A purification factor of 33 and 98% of enzyme yield were achieved in the bottom phase of this system.

V. ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by FAPESP

VI. REFERENCES

- BAILEY, M.J.; BIELY, P. and POUTANEN, K. Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity *Journal of Biotechnology*, 23:257-270, 1992.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3: 286-290, 1985.
- GAIKAWARI, R.; SHENDYE, A.; KULKARNI, N.; RAO, M. Two-phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly(ethylene glycol)- K_2HPO_4 system *Biotech. and Applied Biochem.*, 23: 237-241, 1996.
- KULA, M.R. Trends and future of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation*, 1, 181-189, 1990.
- MANDELS, N. and STENBERG, D. Recent Advances in Cellulase Technology. *J. Ferment. Technol.* 54: 267-286, 1976.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar *Analytical Chemistry* 31, 426-428, 1959.
- SEDMAN, J.J.; GROSSBERG, S.E. A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250 *Analytical Biochemistry* 79: 544-552, 1977.
- SILVA, R.; YIM, D.K.; PARK, Y.K. Application of Thermostable Xylanases from *Humicola sp.* For Pulp Improvement. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77(1): 109-11, 1994.

- SHOHAM, Y.; SCHWARTZ, Z.; KHASIN, A.; GAT, O.; ZOSIM, Z.; ROSENBERG, E. Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6. *Biodegradation* 3: 207-218, 1992.
- PAICE, M. G.; JURASEK, L. Removing hemicellulose from pulps by specific enzymic hydrolysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 4 (2): 187-198, 1984.
- VIKKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13: 335-350, 1994.

IV Iberian Congress on Biotechnology
I Ibero-American Meeting on Biotechnology

BIOTEC'98

BOOK OF ABSTRACTS

Edited by
MANUEL MOTA and EUGÉNIO C. FERREIRA
Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho
4700 Braga, PORTUGAL



Production and Purification of an Alkaline Xylanase using Aqueous Two Phase Systems

Bim, M.A.¹; Duarte, M.C.T.¹; Melo, E.C.¹; Tagliari, C.V.¹ and Franco, T.T.²

¹Biochemical Engineering Laboratory, Chemical Engineering - UNICAMP PO Box 6066, Campinas-SP 13081-970 Brazil

²Biochemical Engineering Laboratory, Chemical Engineering - UNICAMP PO Box 6066, Campinas-SP 13081-970 Brazil e-mail: franco@feq.unicamp.br

Keywords: purification, aqueous two-phase systems, bacillus, xylanase

Xylan is a major component of hemicellulose and one of the most abundant polysaccharides in nature after cellulose. Its structure is made up of β -1,4-linked β -D-xylopyranosides highly substituted. Xylanases catalyse the hydrolysis of xylan but most of the xylanases commercially available have been produced by fungi are active at neutral or acidic pH and their optimum temperature for activity is below 45°C. Various applications for xylanases in bioconversion and food industries have been suggested and one of the major potential applications of xylanases involves the pulp and paper industry. This way, extremophilic enzymes which are active at alkaline conditions have great potential in bleaching process without any need for changes in pH and with the advantage in the release of polluting organic chlorine compounds.

The aim of this work is to optimise the xylanase production, to extract and to purify the enzyme from the crude fermentation broth without cell harvesting and to achieve higher purification factors and enzyme yields.

The composition of the culture media was optimised for the maximisation of the alkaline xylanase levels and the minimisation of cellulases produced by *Bacillus pumillus*. The produced xylanase was able to hydrolyse birchwood xylan at pH 10.0 at 45°C.

The enzyme from crude fermentation broth was extracted by partitioning in aqueous two-phase systems (ATPS) composed of phosphate and polyethyleneglycol (PEG). The effect of tie-line length, PEG molecular weight and NaCl concentrations upon the purification factors and yields of xylanase were investigated by statistical design. The effect of pH and temperature on the xylanase activity were identified.

The complete methodology, the results and the discussion will be shown in a full paper.